

**Mechanismen der Entstehung
strahleninduzierter
Schwesterchromatidenaustausche**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften,
Landschaftsarchitektur

an der

Universität-Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Elisabeth Bruckmann

aus
Kempfen

im April 2000

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden
Experimente wurden im Institut für Genetik
der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. R. Hensel

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. G. Obe

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. W.-U. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2000

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
 1 EINLEITUNG.....	 1
1.1 Zellzyklus.....	2
1.2 Schwesterchromatidenaustausche (SCE).....	5
1.2.1 Entwicklung experimenteller Nachweismethoden für SCE	5
1.2.2 Schwesterchromatidendifferenzierung mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	8
1.2.3 Modelle zur Entstehung von SCE.....	9
1.2.4 Spontane SCE.....	11
1.2.5 Induktion von SCE	14
1.2.6 Die Hypothese der „falschen“ SCE nach γ - oder Röntgenbestrahlung.....	16
1.2.7 Endoreduplikationen (ER).....	19
1.2.7.1 Nutzung des Systems der ER für Experimente dieser Arbeit.....	21
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	24
 2 MATERIAL UND METHODEN	 25
2.1 Sterile Arbeitsbedingungen.....	25
2.2 Zellkultur.....	25
2.3 Methoden der Zellbehandlung.....	27
2.3.1 Markierung der CHO-Zellen mit BrdU oder Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP).....	27
2.3.1.1 Markierung der CHO-Zellen mit BrdU	27
2.3.1.2 Permeabilisierung der Zellen für Biotin-dUTP mit Hilfe der Elektroporation.....	28
2.3.2 Röntgenbestrahlung.....	29
2.3.3 Behandlung mit Mitomycin C (MMC).....	29

2.4 Die Versuchsblöcke.....	30
2.4.1 Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung.....	30
2.4.2 Abhängigkeit der Entstehung von SCE nach Röntgenbestrahlung vom Zellzyklusstadium.....	30
2.4.3 Versuche mit tetraploiden Zellen	30
2.4.4 Experimente mit ER.....	31
2.4.4.1 Bestrahlung unsubstituierter Zellen, Substitution mit BrdU in der nächsten S-Phase und Induktion von ER (\nrightarrow BT-ER)	31
2.4.4.2 Bestrahlung BrdU-markierter Zellen, Substitution mit BrdU in der zweiten S-Phase und Induktion von ER ($B \nrightarrow$ BT-ER).....	32
2.4.5 Einfluß der Substitution von zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen.....	32
2.4.6 Einfluß von BrdU oder Biotin-dUTP auf die Entstehung von SCE nach Behandlung mit MMC.....	32
2.5 Chromosomenpräparation	33
2.6 Differentielle Schwesterchromatidenfärbung.....	34
2.6.1 Fluoreszenz-plus-Giemsa-Färbung	34
2.6.2 Detektion von Biotin mit Tetramethylrhodamin-isothiocyanat(TRITC)- konjugiertem Avidin.....	35
2.6.3 Detektion von BrdU mit Fluorescein-5-isothiocyanat(FITC)-konjugierten Antikörpern	37
2.7 Auswertung.....	38
2.8 Bezugsquellennachweis.....	42
3 ERGEBNISSE.....	44
3.1 Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung.....	44
3.2 Abhängigkeit der Entstehung von SCE nach Röntgenbestrahlung vom Zellzyklusstadium.....	47
3.3 Versuche mit tetraploiden Zellen	50
3.4 Experimente mit ER.....	52
3.4.1 \nrightarrow BT-ER	52
3.4.2 $B \nrightarrow$ BT-ER.....	54
3.5 Einfluß der Substitution von zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen.....	55
3.6 Einfluß von BrdU oder Biotin-dUTP auf die Entstehung von SCE nach Behandlung mit MMC.....	59
3.7 Abbildungen von Metaphasen	63

4 DISKUSSION	66
4.1 Einfluß der Substitution zellulärer DNS mit BrdU auf die SCE-Frequenz	66
4.2 Überprüfung der Hypothese der „falschen“ SCE nach ionisierender Bestrahlung	69
4.3 Substitution zellulärer DNS mit Biotin-dUTP	72
4.4 Röntgenstrahlen induzieren „echte“ und „falsche“ SCE in BrdU-substituierten Zellen, aber nur „falsche“ SCE in Biotin-dUTP-markierten Zellen	75
4.5 Röntgenstrahlen induzieren langlebige Schäden in BrdU-substituierter DNS	77
4.6 Einfluß der Substitution zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die SCE-Induktion mit MMC.....	79
 5 ZUSAMMENFASSUNG	 81
 6 LITERATURVERZEICHNIS	 83

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4BT-ER	Bestrahlung unsubstituierter Zellen, Substitution mit BrdU in der nächsten S-Phase und Induktion von ER
B4BT-ER	Bestrahlung BrdU-markierter Zellen, Substitution mit BrdU in der zweiten S-Phase und Induktion von ER
³ H-Desoxythymidin	Tritium-markiertes Desoxythymidin
4M-Puffer	Puffer, bestehend aus 4xSSC/5% fettfreier Trockenmilch in <i>Aqua dest.</i>
4T-Puffer	Puffer, bestehend aus 4xSSC/0,05% Tween-20 in <i>Aqua dest.</i>
20xSSC	<i>Sodium saline citrate</i> , wäßrige Lösung aus 3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat, Verdünnungsgrade: 4xSSC, 2xSSC
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
BCE	<i>Between chromosome exchange</i>
Biotin-dUTP	Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C-1' bis C-5'	Bezeichnung der Kohlenstoffatome in der Desoxyribose
CA	Chromosomenaberration
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CSA	Chromosomentypaberration
CSA+CTA	Chromosomen- und Chromatidentypaberrationen (in einer Zelle)
CTA	Chromatidentypaberration
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DIZ	Dizentrische Chromosomen
DM	<i>Double minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ER	Endoreduplikation
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyant
FKS	Fötales Kälberserum
FPG	Fluoreszenz-plus-Giemsa
G-Phasen (G1/G2)	<i>Gap</i> -Phasen
mBAND	<i>high-resolution multicolour banding fluorescence in situ hybridization</i>
Medium	McCoy's 5A-Medium, einschließlich Antibiotika
MMC	Mitomycin C
NOR	Nukleolus-organisierende Region
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>Premature chromosome condensation</i>
RDM	Ringchromosomen plus <i>double minutes</i>
S-Phase	Synthesephase
SCE	<i>Sister chromatid exchange</i> , Schwesterchromatidenaustausch
SE	<i>Standard error</i> , Standardfehler der Einzelwerte
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyant
Vollmedium	Medium mit 10% FKS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Strukturformeln von 2'-Desoxythymidin, 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) und Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP).....	7
Abb. 2: Schema zur Schwesterchromatidendifferenzierung nach Markierung entweder der ersten von zwei S-Phasen (A) oder beider S-Phasen (B) mit BrdU und anschließender FPG-Färbung.	8
Abb. 3: Darstellung der Entstehung von <i>Twin</i> -SCE aufgrund S-Phase-abhängiger Läsionen, aber nicht als Folge von CA nach Bestrahlung von unsubstituierten Chromosomen in der G1-Phase, Markierung der nächsten S-Phase mit BrdU und Induktion der ER mit Rotenon (↯BT-ER).	23
Abb. 4: Darstellung der Entstehung von BCE aufgrund S-Phase-abhängiger Läsionen und als Folge von CA nach Bestrahlung von unifilar BrdU-substituierten Chromosomen in der G1-Phase, einer weiteren S-Phase mit BrdU und Induktion der ER mit Rotenon (B↯BT-ER).	23
Abb. 5: Schema zur Auswertung von BCE und SCE	40
Abb. 6: Dosis-Effekt-Beziehung für SCE und RDM nach Röntgenbestrahlung BrdU-markierter CHO-Zellen mit Dosen zwischen 0 und 4,8 Gy. Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und linear-quadratische Regression für SCE ($y = 0,7562x^2 + 1,204x + 9,7986$, $r = 0,99$) und für RDM ($y = 0,0659x^2 + 0,4821x$, $r = 0,98$)	45
Abb. 7: SCE-Frequenzen in Zellen ohne CA, mit CSA oder CSA+CTA nach Röntgenbestrahlung BrdU-substituierter CHO-Zellen. Angegeben ist jeweils die mittlere SCE-Frequenz pro Zelle, der SE und die Signifikanz der Abweichungen. n.s. = nicht signifikant mit $p > 0,05$, * = keine statistische Untersuchung möglich aufgrund zu geringer Zellanzahl	46
Abb. 8: SCE-Frequenz in CHO-Zellen in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt nach Ende der Präinkubation mit BrdU. Die Zellen wurden mit 4,8 Gy bestrahlt. Alle Zellen wurden nach 20 h fixiert (F). Ergebnisse der drei Einzelexperimente sowie der Mittelwert.	49
Abb. 9: Prozentualer Anteil der Zellen ohne CA, mit CSA, mit CSA+CTA oder CTA in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt nach Ende der Präinkubation mit BrdU. Die Bestrahlung erfolgte mit 4,8 Gy. Alle Zellen wurden nach 20 h fixiert.	49
Abb. 10: SCE in diploiden und tetraploiden Zellen nach Bestrahlung BrdU-substituierter CHO-Zellen und anschließender Colcemid-Behandlung. Dargestellt sind die mittleren Frequenzen für SCE und die SEM.	51
Abb. 11: <i>Twin</i> - und <i>Single</i> -SCE in ↯BT-ER. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen sowie die SEM.	53
Abb. 12: BCE und SCE in B↯BT-ER. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM.	55
Abb. 13: SCE in CHO-Zellen nach 4,8 Gy Bestrahlung Biotin-dUTP- oder BrdU-substituierter CHO-Zellen. Zuordnung der SCE nach ihrer Herkunft als SCE der Kontrolle, als strahleninduzierte „falsche“ SCE und strahleninduzierte „echte“ SCE.	59

Abb. 14: Dosis-Effekt-Beziehung für MMC-induzierte SCE nach Substitution von CHO-Zellen mit 0,5 μ M BrdU und Immunfluoreszenzmikroskopie oder Markierung mit 20 μ M BrdU und FPG-Färbung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen und die SEM.	61
Abb. 15: SCE-Frequenzen nach Behandlung von unifilar mit Biotin-dUTP oder 0,5 μ M BrdU substituierten CHO-Zellen mit 0,1 μ M MMC. Dargestellt sind die mittleren Frequenzen an SCE und die SE.	62
Abb. 16: Differentiell gefärbte diploide CHO-Zelle nach Bestrahlung mit 4,8 Gy.	63
Abb. 17: Differentiell gefärbte tetraploide CHO-Zelle mit vielen RDM nach Bestrahlung mit 6 Gy.	63
Abb. 18: <i>Twin</i> - und <i>Single</i> -SCE in ∇ BT-ER nach 3,6 Gy Röntgenbestrahlung.	64
Abb. 19: BCE und SCE in B ∇ BT-ER nach 3,6 Gy Röntgenbestrahlung.	64
Abb. 20: Differentiell mit Biotin-dUTP (a und c) oder 0,5 μ M BrdU markierte Zellen (b und d). Zellen der Kontrollen in (a) und (b), mit 4,8 Gy bestrahlte Zellen in (c) und (d). In (a) sind die von der Auswertung ausgeschlossenen Chromosomen X, Z10 und mit * Z12 und Z13 gekennzeichnet. In (c) ist das X-Chromosom vollständig unmarkiert. Gefüllte Pfeile deuten auf Ringchromosomen, der leere Pfeil weist auf ein DIZ.	65

1 EINLEITUNG

Schwesterchromatidenaustausche (*sister chromatid exchanges*, SCE) sind reziproke, symmetrische Austausche an homologen Stellen zwischen den zwei genetisch identischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms. Die Darstellung von SCE ist nur möglich, wenn die beiden Schwesterchromatiden im Mikroskop voneinander unterschieden werden können. Dies erfordert die Substitution eines Nukleotids in der Desoxyribonukleinsäure (DNS), die im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Der übliche Substituent ist 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), das während der DNS-Synthese anstelle von Desoxythymidin eingebaut wird. Die cytologische Differenzierung erfolgt routinemäßig mit der Fluoreszenz-plus-Giemsa-Technik (FPG).

Die molekularen Mechanismen der Entstehung von SCE sind bis heute nicht verstanden. SCE werden als Ereignisse der Synthese-Phase (S-Phase) angesehen, denn der Austausch erfordert aufgrund der Antiparallelität der DNS zwei DNS-Doppelstränge. SCE können aber auch entstehen, wenn bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) in der DNS BrdU-substituierte mit unsubstituierten DNS-Einzelsträngen verknüpft werden und nachfolgend eine S-Phase durchlaufen wird. Daher kann erwartet werden, daß viele Chromosomenaberrationen (CA) mit SCE einhergehen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der jeweiligen Anteile an SCE, die entweder S-Phase-abhängig oder als Folge von CA entstehen. Als mutagenes Agens boten sich Röntgenstrahlen an, weil sie unabhängig von der S-Phase CA erzeugen können. Zudem ist die Einwirkungsdauer im Gegensatz zur Behandlung mit chemischen Mutagenen zeitlich eng begrenzt. Als Testsystem wurde die Zelllinie *Chinese Hamster Ovary* (CHO) benutzt. CHO-Zellen sind einfach zu kultivieren und eignen sich aufgrund ihres niedrigen, relativ stabilen Chromosomensatzes von 21 Chromosomen sehr gut für cytogenetische Untersuchungen.

Weil der SCE-Test routinemäßig in der Mutagenitätsforschung eingesetzt wird, ist die Kenntnis über den Einfluß des Substituenten BrdU auf die Entstehung von SCE von größter Bedeutung. BrdU ist in der Position 5 des Pyrimidinrings halogeniert und neigt insbesondere bei ionisierender Bestrahlung zur radikalen Dissoziation. Der Einfluß von BrdU auf die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen wurde überprüft, indem die Wirkung der üblich verwendeten Konzentration von 20 µM BrdU mit der niedrigen BrdU-

Dosis von 0,5 μM verglichen wurde. Bei dem niedrigen Substitutionsgrad war eine Differenzierung mit der FPG-Methode nicht mehr möglich. Dies erforderte den Einsatz von Antikörpern gegen BrdU, die immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurden. Weiterhin wurde Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP) als Substituent eingesetzt. Aufgrund seiner chemischen Struktur darf angenommen werden, daß Biotin-dUTP unter Bestrahlung keine radikalische Reaktion zeigt. Der Nachweis einer Inkorporation in die DNS erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem Avidin.

Die Mitwirkung des BrdU an der Induktion von SCE wurde vergleichend auch nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC), einem chemischen, S-Phase-abhängigen Mutagen, untersucht.

1.1 Zellzyklus

Eukaryote Zellen vermehren sich in einem zyklischen Prozeß aus Wachstum und Teilung. Der Zellzyklus gliedert sich in die Interphase und die Teilungsphase.

Bei der Zellteilung muß sichergestellt werden, daß alle wesentlichen Zellbestandteile gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Von elementarer Bedeutung ist die Weitergabe identischer Kopien des Erbmateri als, der DNS. Die DNS ist ein Biopolymer, dessen Bausteine die Nukleotide sind. Nukleotide bestehen aus dem Zucker Desoxyribose, einem Phosphatrest und einer Purin- oder Pyrimidinbase. Als Nukleoside bezeichnet man die Verbindung von Zucker und Base. Der Name des Nukleosids leitet sich von der Base ab, zum Beispiel enthält Desoxythymidin die Pyrimidinbase Thymin. Zucker und Phosphat bilden das polare Rückgrat der DNS. Die Polarität des DNS-Einzelstrangs wird mit 3' für die Bindungsstelle des folgenden Nukleotids am Kohlenstoffatom C-3' des Zuckers und mit 5' für die Bindungsstelle des Phosphats am C-5' des Zuckers bezeichnet. Zwei antiparallel angeordnete DNS-Einzelstränge bilden einen DNS-Doppelstrang, der über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zusammengehalten wird. Es paaren sich Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin.

Die Verteilung identischer Kopien der DNS wird in eukaryoten Zellen mit Hilfe der Mitose gewährleistet. Die Mitose wird unterteilt in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Im folgenden soll kurz der Mitoseablauf in tierischen Zellen dargestellt werden.

Lichtmikroskopisch erkennbar, beginnt in der Prophase die Kondensation des relativ homogenen Kernmaterials, des Chromatins, zu einzelnen fädigen Strukturen, den Chromosomen. Der Nukleolus löst sich auf, und gegen Ende der Prophase zerfällt die Kernhülle. Die Chromosomen werden zunehmend dicker und kürzer. Jedes Mitosechromosom besteht aus zwei Chromatiden, die am Zentromer verbunden sind. Jede Chromatide enthält einen durchgehenden DNS-Doppelstrang, der mit basischen Histon-Proteinen und Nicht-Histonproteinen assoziiert ist. Diese Assoziation mit Proteinen ermöglicht eine Verpackung der DNS in mehreren Ordnungsstufen bis hin zur maximalen Kondensation der Chromosomen während der Metaphase der Mitose. Die Schwesterchromatiden sind so fest aneinander gekoppelt, daß eine asymmetrische Kondensation nach Einbau von BrdU und Färbung mit Hoechst 33258 zur Krümmung des gesamten Chromosoms führt. Die konvexe Seite liegt dabei an der stärker mit BrdU substituierten Chromatide (GOYANES und MÉNDEZ 1982). Die Verbindung der Schwesterchromatiden wird wahrscheinlich zwischen den bereits von MARSDEN und LAEMMLI (1979) elektronenmikroskopisch dargestellten radialen Schlaufen aus Chromatin beider Chromatiden hergestellt (TAYLOR 1990). Verantwortlich für die Schwesterchromatidenpaarung ist der Multiproteinkomplex Cohesin, der während der Replikation eingefügt wird und einem kontrolliertem zellzyklusabhängigen Abbau unterliegt (ALEXANDRU *et al.* 1999).

Von den gegenüberliegenden Polen der Zelle wird der Spindelapparat aufgebaut. Bündelweise angeordnete Mikrotubuli bilden die Spindelfasern. Diese können sich am Kinetochor, einer Struktur nahe des Zentromers auf jeder Chromatide, anheften. In der Metaphase werden die Chromosomen mit Hilfe des Spindelapparats über eine Pendelbewegung auf der Äquatorialebene angeordnet. Die Anaphase beginnt mit dem Anaphasesprung: Unter Abbau des Cohesins erfolgt die vollständige Trennung der beiden Chromatiden, die nun als Tochterchromosomen bezeichnet werden. Der Spindelapparat zieht die Tochterchromosomen zu den Zellpolen und schiebt gleichzeitig die Pole auseinander, so daß sich die Zelle streckt.

Die Telophase beginnt, wenn die Chromosomen die Pole erreicht haben. Die Chromosomen dekontensieren und bilden das Chromatin, in dem die Chromosomen nicht mehr einzeln zu erkennen sind. Eine neue Kernhülle entsteht unter dem Einfluß der Chromosomen, und die Nukleolus-organisierenden Regionen (NOR) bauen die Nukleoli wieder auf. Die Zellteilung wird mit der Zytokinese abgeschlossen. Der Zelleib wird unter Beteiligung der Mikrofilamente Aktin und Myosin zwischen den beiden Kernen durchgeschnürt. Nach der Bildung der Tochterzellen ist die Teilungsphase abgeschlossen.

Die Zellen befinden sich nun in der Interphase. Sie wird eingeteilt in zwei *Gap*-Phasen (G-Phasen), in denen keine DNS-Synthese nachweisbar ist, und eine zwischen G1- und G2-Phase liegende S-Phase, in der das genetische Material verdoppelt wird.

In der G1-Phase vollbringt die Zelle große Stoffwechselleistungen. Es ist die zeitlich sehr variable Wachstumsphase der Zelle, in der sie biosynthetisch hochaktiv ist. Für den allgemeinen Stoffwechsel notwendige und häufig auch gewebetypische Proteine werden gebildet.

Nach der G1-Phase tritt die Zelle in die S-Phase ein. In der S-Phase wird aus dem Chromosom, das bis zu diesem Zeitpunkt nur aus einer Chromatide besteht, ein Chromosom, das zwei Chromatiden besitzt. Dieser Vorgang wird Replikation genannt. Bei der Replikation wird der in der Chromatide enthaltene DNS-Doppelstrang zwischen den Basen längsgeteilt, und an jedem der beiden Einzelstränge wird ein neuer Einzelstrang synthetisiert. Der neue Doppelstrang besteht also jeweils aus einem alten und einem neuen Strang, der Mechanismus ist somit semikonservativ.

Die Replikation verläuft nicht kontinuierlich von einem Ende des Chromosoms zum anderen, dies würde viel zu lange dauern. Statt dessen gibt es eine Vielzahl von Startpunkten, so daß die DNS abschnittsweise, aber an vielen Stellen gleichzeitig repliziert wird. Es bilden sich Replikationsblasen, an denen die DNS schrittweise aufgetrennt wird und die beiden neuen Stränge synthetisiert werden. Das zentrale Enzym der Replikation ist die DNS-Polymerase, die in 5'-3'-Richtung freie Nukleotide an eine schon vorhandene, neu synthetisierte Nukleotidkette anhängt. Aufgrund der Antiparallelität der beiden DNS-Einzelstränge kann nur ein Strang durchgehend synthetisiert werden. Dieser Strang wird *leading strand* genannt. Der andere *lagging strand* wird mit Hilfe von OKAZAKI-Fragmenten stückweise und in bezug auf das Fortschreiten der Replikationsgabel rückwärts repliziert.

Die Replikation verläuft in festgelegten Einheiten, den Replikons. Zwischen 10 und 100 DNS-Replikons bilden chromosomale Replikationseinheiten. Alle DNS-Replikons einer chromosomalen Replikationseinheit beginnen gleichzeitig mit der Replikation (LAU und ARRIGHI 1981). Euchromatische Abschnitte mit aktiven Genen werden früher repliziert als Heterochromatin mit inaktiven Genen oder hochrepetitiven genleeren Sequenzen.

Wenn alle Chromosomen durchgängig repliziert sind, erfolgt der Übergang in die G2-Phase. Die Zelle wächst weiter und bereitet sich auf die nachfolgende Mitose vor. Nach Überschreiten eines Restriktionspunktes tritt die Zelle in die Mitose ein.

1.2 Schwesterchromatidenaustausche (SCE)

1.2.1 Entwicklung experimenteller Nachweismethoden für SCE

SCE wurden erstmals 1938 von Barbara McCLINTOCK nach der Beobachtung von Mitosen mit Ringchromosomen im Endosperm des Mais postuliert. Die Ringchromosomen bildeten während der Anaphase häufig doppelt große ringförmige Chromosomen mit zwei Zentromeren, die zwischen den beiden Spindelpolen aufgespannt wurden. Als Ursache nahm McCLINTOCK (1938) Austausche zwischen den Schwesterchromatiden der Ringchromosomen an.

Die erste Darstellung von SCE gelang 1957 TAYLOR *et al.* mit Hilfe der Autoradiographie in Zellen des Wurzelmeristems von *Vicia faba* nach Inkorporation von Tritium-markierten Desoxythymidin (^3H -Desoxythymidin) in der vorletzten Replikation vor der Fixierung. Mit dieser Versuchsanordnung waren die Mitosechromosomen in einer von beiden Chromatiden radioaktiv markiert. Häufig konnte ein Wechsel der radioaktiven Markierung zwischen den Schwesterchromatiden beobachtet werden. Besonders aufschlußreich war die Auswertung von *Twin*-SCE und *Single*-SCE in Wurzelmeristemzellen von *Bellevalia romana*, die nach 6 bis 8 Stunden Behandlung mit dem radioaktiven Isotop und anschließender Colchicinbehandlung für 10 Stunden tetraploid waren und Schwesterchromatidendifferenzierung zeigten. Als *Twin*-SCE bezeichnete TAYLOR SCE an gleicher Position in zwei homologen Chromosomen, als *Single*-SCE solche, die einzeln vorkamen (TAYLOR 1958). Die Ergebnisse ließen sich sehr gut mit der Theorie der semikonservativen Replikation der DNS von WATSON und CRICK (1953) in Deckung bringen und führten zu der später bewiesenen These, daß eine Chromatide einen einzigen durchgehenden DNS-Doppelstrang enthält. Mit Hilfe dieser Erklärung konnten *Twin*-SCE dem ersten Zellzyklus, *Single*-SCE dem zweiten Zellzyklus zugeordnet werden.

Eine Schwesterchromatidendifferenzierung ohne autoradiographische Markierung wurde zum ersten Mal 1967 von HUANG in Chromosomen von *Mastomys natalensis* nach Behandlung mit hohen Dosen BrdU beobachtet. Die von HUANG (1967) beschriebene Differenzierung der Schwesterchromatiden wurde jedoch erst 1972 von ZAKHAROV und EGOLINA eingehender untersucht. Die Anwesenheit hoher Dosen BrdU im Medium für die Dauer von zwei Zellzyklen erzeugte in Zellen des Chinesischen Hamsters eine Schwesterchromatidendifferenzierung nach Giemsa-Färbung. Dieses Verfahren hatte in bezug auf die Untersuchung von SCE allerdings schwerwiegende Nachteile: Die hohen

Konzentrationen von BrdU inhibierten den Zellzyklus und die Kondensation der Chromatiden in der Mitose. Außerdem lag der Verdacht nahe, daß BrdU neben CA auch SCE induzieren kann.

Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, zum Beispiel Hoechst 33258 (LATT 1973), ermöglichte eine erhebliche Senkung der für die Schwesterchromatidendifferenzierung notwendigen BrdU-Konzentration. Hoechst 33258 lagert sich spezifisch in Adenin-Thymin-reichen Sequenzen an die DNS und fluoresziert grünlich. Die Substitution mit BrdU erhöht die Bindungsstärke des Fluoreszenzfarbstoffs um etwa das Vierfache, dämpft jedoch die Fluoreszenz (*Quenching*) bei einem pH > 4 und hohem Ionengehalt (LATT und WOHLLEB 1975). Der Nachteil dieser Färbetechnik lag in der erheblichen Photoinstabilität, die Präparate blichen so schnell aus, daß die Auswertung nur über Photographie erfolgen konnte.

PERRY und WOLFF entwickelten 1974 die erste permanente differentielle Schwesterchromatidenfärbung, die FPG-Technik, die eine Analyse der SCE im Hellfeld-Durchlicht-Mikroskop erlaubt. Die Autoren behandelten die Präparate zunächst mit Hoechst 33258, ließen sie 24 Stunden bei Tageslicht altern, inkubierten sie für 2 Stunden bei 62,5 °C und schlossen eine Giemsa-Färbung an. HILL und WOLFF stellten 1982 eine Modifikation dieser Methode vor, die mit kleinen Abweichungen bis heute als Routineverfahren zur Schwesterchromatidendifferenzierung in vielen Laboratorien verwendet wird. Nach der Inkubation in Hoechst 33258 wurden die Präparate in Puffer auf einer Heizplatte bei 60 °C für 10 min mit Schwarzlicht (ultraviolettem Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm) bestrahlt und nachfolgend mit Giemsa-Lösung gefärbt. Dieses Verfahren nutzt das BrdU-abhängige *Quenching* der Fluoreszenz aus, denn der Anteil der Energie, der nun nicht über Fluoreszenz abgegeben werden kann, verursacht Schwingungsbewegungen in der DNS, die mit Hitze und ultraviolettem Licht so verstärkt werden können, daß sie die DNS partiell zerstören (HOLMQUIST und MOTARA 1987). In derart behandelten Chromosomen färbt sich die stärker mit BrdU substituierte Chromatide daher schwächer mit Giemsa-Lösung und erscheint im Lichtmikroskop heller.

Der Einsatz von BrdU zur Markierung der DNS ist aber aufgrund seiner genetischen Toxikologie problematisch (MORRIS 1991). Die Beeinflussung der Frequenz von SCE durch die Markierung mit BrdU war offensichtlich und schuf den Bedarf, die BrdU-Konzentration weitestmöglich zu senken. Dies wurde realisierbar mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper gegen BrdU (PINKEL *et al.* 1985). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-

mikroskopie gelang es NATARAJAN *et al.* (1986), den Substitutionsanteil von BrdU gegenüber Desoxythymidin auf 0,5 % zu reduzieren.

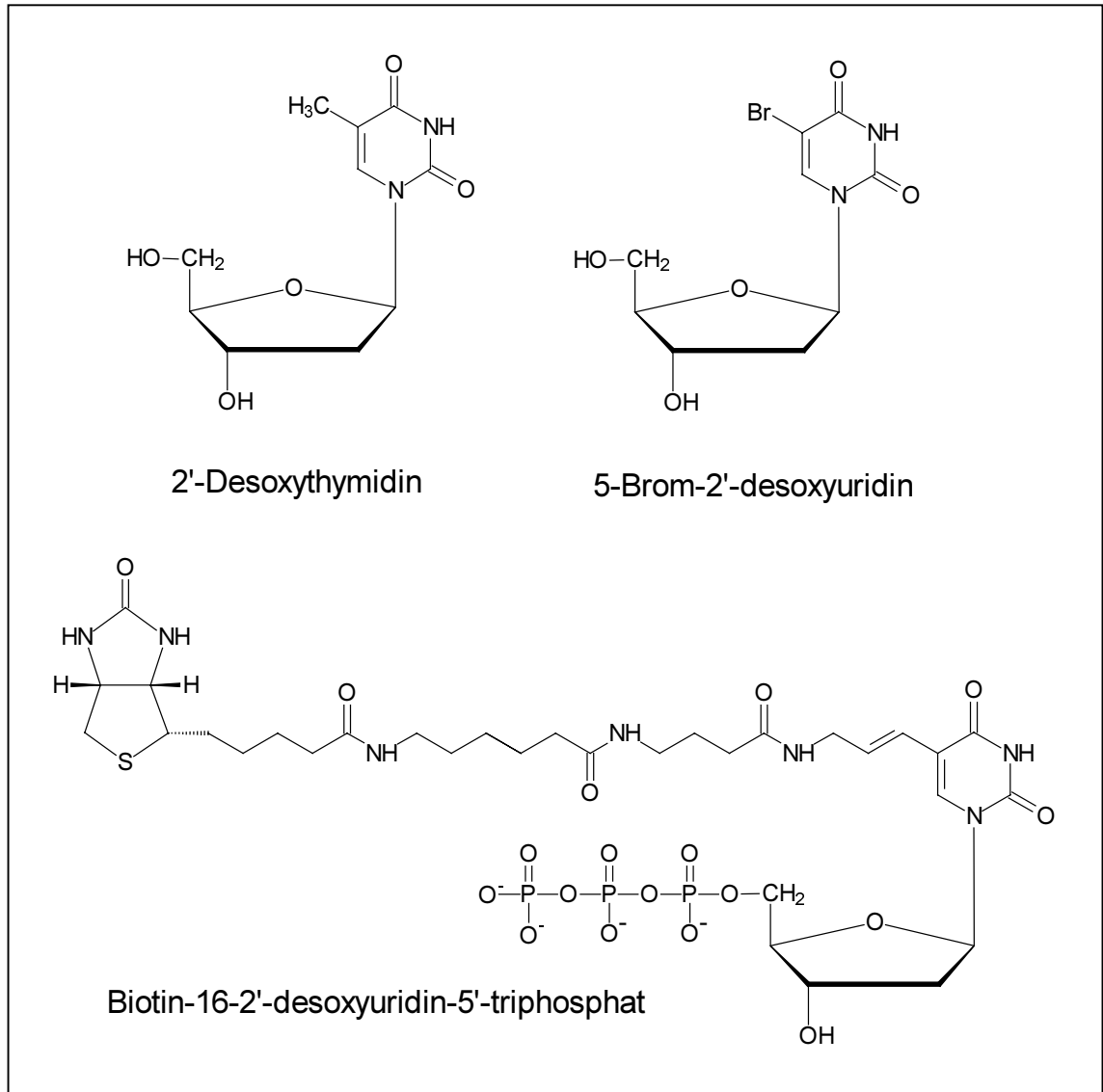


Abb. 1: Strukturformeln von 2'-Desoxythymidin, 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) und Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP).

In dieser Arbeit wird eine Methode der Schwesterchromatidendifferenzierung ohne BrdU vorgestellt. Die Markierung der DNS erfolgte mit Biotin-dUTP, das mit Avidin und TRITC-konjugiertem Anti-Avidin nachgewiesen wurde (BRUCKMANN *et al.* 1999a).

1.2.2 Schwesterchromatidendifferenzierung mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)

Aufgrund der semikonservativen Replikation der DNS kann eine Differenzierung der Schwesterchromatiden mit BrdU erst nach zwei S-Phasen erreicht werden. Deshalb muß mit der BrdU-Behandlung zwei Zellzyklen vor der Fixierung begonnen werden. Nach der ersten Replikation mit BrdU besitzen beide Chromatiden einen alten, unmarkierten und einen neuen, mit BrdU-substituierten DNS-Einzelstrang. Fixierung in der folgenden Mitose und anschließende FPG-Färbung ergäbe uniform gefärbte Chromosomen. Die zweite S-Phase kann in Ab- oder Anwesenheit von BrdU erfolgen. Danach enthält im ersten Fall eine Chromatide einen unmarkierten und einen BrdU-haltigen DNS-Einzelstrang, die andere Chromatide ist gar nicht markiert. Bei der zweiten Möglichkeit ist eine Chromatide vollständig mit BrdU substituiert, und die andere Chromatide besitzt einen BrdU-freien und einen BrdU-substituierten DNS-Einzelstrang (Abb. 2).

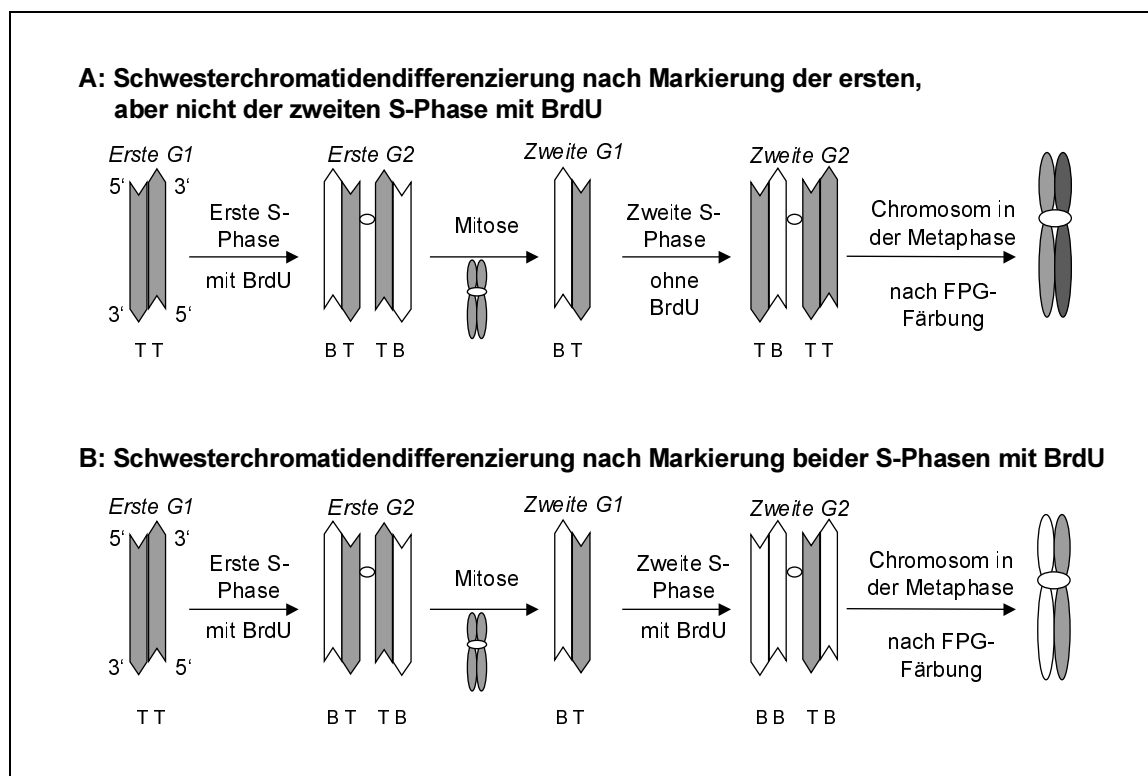


Abb. 2: Schema zur Schwesterchromatidendifferenzierung nach Markierung entweder der ersten von zwei S-Phasen (A) oder beider S-Phasen (B) mit BrdU und anschließender FPG-Färbung. Paare gegenseitig ausgerichteter Pfeile repräsentieren DNS-Moleküle mit ihren 3'- und 5'-Enden. Schattierte Pfeile enthalten Desoxythymidin (T), ungefärbte BrdU (B). Ovale stellen Zentromere dar. Nach FPG-Färbung erscheint die Chromatide mit BrdU (A), beziehungsweise mit dem höheren BrdU-Gehalt (B) heller.

1.2.3 Modelle zur Entstehung von SCE

Die Entstehungsmechanismen von SCE sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. SCE werden als Ereignisse der S-Phase angesehen, denn sie bedürfen aufgrund der Antiparallelität der DNS zweier DNS-Doppelstränge zum Austausch. Es wurden einige Modelle entwickelt, die zu erklären versuchen, wie SCE entstehen. Diese Modelle lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Vertreter der einen Gruppe nehmen an, daß SCE direkt an oder unmittelbar hinter der Replikationsgabel gebildet werden und Resultat von Reparaturereignissen oder Umgehung eines DNS-Schadens mit Hilfe einer DNS-Einzelstrangrekombination sind (EVANS 1977, KATO 1977, SHAFER 1977, ISHII und BENDER 1980, LINDENHAHN und SCHUBERT 1983, SCHUBERT 1990). Die andere Gruppe betrachtet SCE als postreplikative Ereignisse der S-Phase, die nicht unmittelbar mit dem DNS-Schaden in Verbindung stehen, sondern als Folge der Replikationsblockade aufgrund dieses Schadens zu werten sind (PAINTER 1980) oder das Ergebnis einer gegengleichen Verknüpfung von DNS-Doppelsträngen bei der Entwindung der Tochterhelices durch Topoisomerasen darstellen (CLEAVER 1981). Topoisomerasen sind Enzyme, die die Verwindungszahl der DNS verändern können, indem sie einen oder beide Stränge der DNS spalten, damit ein DNS-Abschnitt durch die entstandene Lücke durchtreten kann, und anschließend die Bruchstellen wieder verknüpfen. Stellvertretend sollen im folgenden die Modelle von PAINTER (1980) und SCHUBERT (1990) vorgestellt werden.

PAINTERS Replikationsmodell geht davon aus, daß DSB häufig an der Verbindungsstelle zwischen zwei angrenzenden Replikons stattfinden. Die SCE-Bildung wird eingeleitet, wenn die Schwesterchromatiden eines bereits duplizierten Replikons mit den parental Strängen einer noch nicht vollständig replizierten Einheit rekombiniert werden. Die dafür notwendigen Brüche können von Topoisomerasen induziert und wieder zusammengefügt werden. Ein SCE wird vervollständigt, wenn das später duplizierte Replikon ebenfalls komplett verdoppelt ist und mit dem früher duplizierten Replikon verbunden wird. Je länger dieser Zustand der Koexistenz einer zwei- und einer viersträngigen DNS anhält, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Bruchinduktion durch Topoisomerasen. Der Ort des SCE entspricht dabei nicht dem Ort des Primärschadens.

SCHUBERT (1990) erklärt die Entstehung der SCE über die Umgehung einer die Replikation hindernden Läsion mit einem Rekombinationsbypass, innerhalb dessen DNS-Einzelstränge beider Schwesterchromatiden rekombiniert werden. Ein präreplikativer Schaden in der DNS behindert die Replikation und verursacht eine Lücke im

komplementären Tochterstrang. Diese wird von dem komplementären parentalen Strang geschlossen. Der Tochterstrang kann nun mit der Replikation unter Nutzung des anderen, schon replizierten, komplementären Tochterstrangs fortfahren. Aufgrund von Isomerisierung bilden sich auf beiden Seiten der ehemaligen Lücke je eine kreuzförmige DNS-Konfiguration (HOLLIDAY-Struktur). Diese Kreuzformationen werden über diagonale Inzision aufgelöst, die entweder zu einem mikroskopisch nicht erkennbaren Einzelstrang-austausch über einen kurzen DNS-Abschnitt oder aufgrund eines DNS-Doppelstrang-austauschs zu einem SCE führt. Das SCE befindet sich nahe dem Ort des Primärschadens.

Der mit diesem Modell vorgeschlagene Mechanismus der Entstehung von SCE ähnelt dem HOLLIDAY-Modell der genetischen Rekombination während der Meiose (HOLLIDAY 1964).

Trotz großen experimentellen Aufwands konnte bis heute keines der Modelle eindeutig belegt werden. Ein Hinweis auf die Richtigkeit des Modells, das die Entstehung von SCE in der Nähe des Primärschadens über abschnittsweise Rekombination von DNS-Einzelsträngen beschreibt, könnte aus Versuchen von ROMMELAERE und MILLER-FAURÈS (1975) abgeleitet werden. Die Autoren markierten Zellen des Chinesischen Hamsters für eine S-Phase mit BrdU und fanden DNS-Segmente mit einer BrdU-BrdU-Duplex. Die maximal 20 000 Basenpaare langen Abschnitte könnten rekombinierte DNS-Einzelstränge im Sinne dieses Modells repräsentieren.

Für dieses Modell sprechen auch die Ergebnisse von SONODA *et al.* (1999), daß in Zellen von zwei Hühnerzelllinien, die infolge eines Gendefekts in RAD51 oder RAD54 keine homologe Rekombination durchführen konnten, eine erniedrigte Frequenz an SCE auftrat.

Es gibt jedoch ebenfalls Hinweise darauf, daß PAINTERS Annahme über die Lokalisation der SCE an den Verbindungsstellen zwischen Replikons (PAINTER 1980) zutreffend ist. SHAFER entwickelte zwar selbst ein Replikationsbypassmodell (SHAFER 1977), beschreibt aber in demselben Artikel, daß SCE gehäuft an den Verknüpfungsstellen zwischen Replikationseinheiten beobachtet werden.

Eine sich direkt aus dem Modell ergebende Konsequenz ist die Erwartung, daß sich SCE gehäuft an den Grenzen zwischen Eu- und Heterochromatin befinden, weil Euchromatin früh und Heterochromatin spät während der S-Phase repliziert wird. Dies läßt sich mit verschiedenen Bänderungstechniken darstellen. Es werden G-, Q-, R- und C-Banden unterschieden. G- für Giemsa- und Q- für Quinacrin-Banden entsprechen einander funktionell, denn sie färben heterochromatische Bereiche stärker an als euchromatische

Abschnitte. Die Abkürzung R- steht für reverse Bänderung, sie färbt umgekehrt Euchromatin stärker als Heterochromatin. C-Banden enthalten konstitutives Heterochromatin, das vor allem zentromernah vorkommt. Die Ergebnisse bezüglich der Lokalisation von SCE innerhalb der Banden sind nicht eindeutig, teilweise sogar widersprüchlich (zusammengestellt von SCHUBERT und RIEGER 1981), jedoch scheinen SCE tatsächlich überdurchschnittlich häufig an den Grenzen zwischen Eu- und Heterochromatin vorzukommen (SCHUBERT und RIEGER 1981, RACHEL *et al.* 1991, SATOH und OBARA 1995). Eine weitere Häufung der SCE wurde im Bereich der NOR gefunden (SCHUBERT *et al.* 1979, SATOH und OBARA 1995).

LUGO *et al.* (1989) kombinierten in einer Studie *in vivo* mit Knochenmarkszellen der Maus das Verfahren zur vorzeitigen Chromosomenkondensation (*premature chromosome condensation*, PCC) mit differentieller Schwesterchromatidenfärbung. Sie fanden, daß die kleinsten SCE-Segmente mit der Größe chromosomaler Replikons übereinstimmten. In diesem Verfahren wurden SCE erst gegen Ende der S-Phase sichtbar, wenn später replizierende Einheiten mit bereits verdoppelten Abschnitten zusammengefügt wurden. Es wurden keine SCE innerhalb eines chromosomalen Replikons gefunden. LUGO *et al.* (1989) nehmen daher an, daß die Bildungsorte der SCE den Verbindungsstellen zwischen chromosomalen Replikons entsprechen. Demnach ist die Verteilung der SCE nicht zufällig, und es existiert ein kleinstmöglicher Abstand zwischen zwei SCE mit der Größe des kleinsten chromosomalen Replikons.

1.2.4 Spontane SCE

Die Frage nach der Häufigkeit spontaner SCE läßt sich bis heute nicht eindeutig beantworten, denn die Darstellung der SCE setzt in der Regel die Inkorporation eines künstlichen Nukleotids voraus. Nachdem schon TAYLOR (1958) CA in Tritium-markierten Zellen beobachtet hatte, konnte später nachgewiesen werden, daß das ³H-Desoxythymidin aufgrund seines radioaktiven Zerfalls auch SCE induzieren kann (BREWEN und PEACOCK 1969, GIBSON und PRESCOTT 1972). Auch BrdU war bereits vor Einführung der FPG-Methode für zahlreiche toxikologische Wirkungen bekannt. BrdU hemmt das Wachstum von Zellen in Kultur (HAKALA 1959, ZAKHAROV und EGOLINA 1972, REICHARD 1988), verringert den Kondensationsgrad der Chromosomen, insbesondere des Heterochromatins, und induziert CA (HSU und SOMERS 1961, HUANG 1967, ZAKHAROV und EGOLINA 1972, NATARAJAN *et al.* 1980, ZWANENBURG *et al.* 1984). BrdU sensibilisiert

zudem die DNS für ultraviolettes Licht und ionisierende Strahlung (DJORDJEVIC und SZYBALSKI 1960, DEWEY und HUMPHREY 1965, BENDER *et al.* 1973, LUCHNIK *et al.* 1981, WOLFF und FIJTMAN 1981, ILIAKIS *et al.* 1991) und führt zu Punktmutationen, wenn es in der DNS statt in der Ketoform in der Enolform vorliegt. Diese beiden Isomere des BrdU unterscheiden sich nur in der Lage einer Doppelbindung. Die Enolform paart sich jedoch mit Guanin statt mit Adenin (FREESE 1959, DAVIDSON *et al.* 1988, KAUFMAN 1988).

WOLFF und PERRY konnten 1974 nachweisen, daß die Anzahl der SCE pro Zelle in Abhängigkeit von der BrdU-Dosis ansteigt. Mit der FPG-Methode war es möglich, die zur Schwesterchromatidendifferenzierung in CHO-Zellen notwendige Konzentration an BrdU bis auf 0,25 μM zu senken. Eine zuverlässige Extrapolation der Ergebnisse bis zur Konzentration 0 war jedoch aus statistischen Gründen nicht möglich (PERRY und WOLFF 1974). Eine weitere Reduktion der BrdU-Dosis konnte mit dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen BrdU erreicht werden (PINKEL *et al.* 1985). Mit dieser Nachweismethode erstellten NATARAJAN *et al.* (1986) eine Dosis-Effekt-Beziehung für BrdU-induzierte SCE in CHO-Zellen in Abhängigkeit vom BrdU-Gehalt in der DNS. Die Substitutionsgrade lagen zwischen 0,5 und 100 % und wurden über verschiedene Mischungsverhältnisse von BrdU und Desoxythymidin reguliert. Gleichzeitig wurde die zelleigene Desoxythymidinsynthese mit 5-Fluordesoxyuridin inhibiert. Bis zu einem Substitutionsgrad von 30 % wurde ein nahezu linearer Anstieg der SCE verzeichnet, bei höheren Substitutionsgraden war der Anstieg der SCE flacher. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß NATARAJAN *et al.* (1986) für die Substitutionsgrade zwischen 30 und 100 % die FPG-Technik als Nachweismethode einsetzten. Bei dem niedrigsten Substitutionsgrad von 0,5 % wurden etwa vier SCE pro Zelle gefunden, dies entspricht etwa zwei SCE pro Zelle pro Zellzyklus.

Mit der üblichen Methode zur Schwesterchromatidendifferenzierung in diploiden Zellen ist die Zuordnung eines SCE zu dem Zellzyklus, in dem es entstanden ist, unmöglich. Es besteht jedoch ein wichtiger Unterschied zwischen der ersten und der zweiten S-Phase, der die Entstehung von SCE beeinflussen kann: Während der ersten Replikation dient unmarkierte DNS als Matrize, während der zweiten Replikation dagegen BrdU-haltige DNS. Es gibt viele Hinweise darauf, daß während der Synthese des Tochterstrangs unter Verwendung einer BrdU-haltigen Matrize DNS-Einzelstrangbrüche auftreten können, deren Reparatur möglicherweise zu SCE führt. Bei gestörter DNS-Einzelstrangbruch-Reparatur ist die Anzahl der SCE erheblich gesteigert. Dies läßt sich an Zellen von Patienten mit BLOOM-Syndrom beobachten (CHAGANTI *et al.* 1974, SHIRAISHI *et al.* 1983,

OCKEY und SAFFHILL 1986) sowie an der CHO-Mutante EM9, die ähnliche Reparaturdefizite aufweist (DILLEHAY *et al.* 1984). Experimentell kann ein vergleichbares Defizit mit der Verwendung eines Inhibitors für das Enzym Poly-(ADP-ribose)-polymerase, 3-Aminobenzamid, während der Replikation erzeugt werden (NATARAJAN *et al.* 1981, ZWANENBURG und NATARAJAN 1984). In allen Fällen war die SCE-Frequenz deutlich erhöht, wenn BrdU-substituierte DNS repliziert wurde. KAUFMAN (1986) zeigte zusätzlich, daß nicht nur die Replikation an einer BrdU-haltigen Matrize, sondern auch eine Imbalance des Nukleotidpools, die mit dem externen Angebot von DNS-Bausteinen einhergeht, zu einer Erhöhung der SCE-Frequenz führt.

Eine Methode, die eine Zuordnung der SCE zu dem Zellzyklus ihrer Entstehung erlaubt, kann wertvolle Informationen liefern. In diploiden Zellen ist dies möglich in einer dreistufigen Schwesterchromatidendifferenzierung (SCHVARTZMAN und GOYANES 1980), bei der im ersten Zellzyklus eine niedrige Dosis BrdU und in den beiden folgenden Zellzyklen eine hohe Dosis BrdU angeboten wird. SCE des ersten Zellzyklus sind sichtbar als Farbwechsel von dunkel zu mitteldunkel auf einer Chromatide, SCE des zweiten Zellzyklus als Farbwechsel von dunkel auf der einen Chromatide zu mitteldunkel auf der anderen Chromatide desselben Chromosoms, SCE des dritten Zellzyklus entsprechen dem bekannten SCE-Muster von dunkel nach hell oder von mitteldunkel nach hell. MORALES-RAMÍREZ *et al.* (1987) untersuchten mit dieser Methode *in vivo* die Abhängigkeit der SCE-Frequenzen von der BrdU-Konzentration an Knochenmarkszellen der Maus. Die Befunde bestätigten die Annahme, daß die Replikation an BrdU-substituierter DNS die SCE-Entstehung begünstigt. Nur sehr wenige SCE stammten aus dem ersten Zellzyklus, in 65 % der Zellen war während des ersten Zellzyklus kein SCE entstanden. MORALES-RAMÍREZ *et al.* (1987) berechneten die spontane Häufigkeit der SCE *in vivo* bei der Maus auf nur 0,15 SCE pro Zelle pro Zellzyklus. Diese sehr niedrige Anzahl der SCE könnte mit der Versuchsdurchführung *in vivo* zusammenhängen, die weniger anfällig ist für die Beeinflussung der Entstehung von SCE etwa aufgrund einer Imbalance des Nukleotidpools.

Eine Möglichkeit, SCE ohne vorherige Markierung der DNS nachzuweisen, besteht in der bereits von MCCLINTOCK (1938) beschriebenen Beobachtung von Ringchromosomen während der Anaphase. MICHAELIS (1959) untersuchte Blütenblätter einer Mutante des Löwenmäulchens *Antirrhinum majus*, die sich durch das regelmäßige Vorkommen eines Ringchromosoms auszeichnete. In 26,1 % der Anaphasen wurden Anaphasebrücken gefunden, die entweder aus doppeltgroßen oder aus zwei normalgroßen, ineinander verschlungenen Ringchromosomen bestanden. Die doppeltgroßen Ringe könnten nach

einem oder einer ungeraden Anzahl von SCE entstanden sein, die beiden verschlungenen Ringe nach zwei oder einer geraden Anzahl von SCE. SUTOU (1981) ermittelte in Zellen des Chinesischen Hamsters mit einem Ringchromosom eine Spontan-Frequenz von 4,14 SCE pro Zelle pro zwei Zellzyklen, geschätzt aus der Beobachtung der Verdrillung des Ringchromosoms, das im Durchschnitt 0,235 SCE aufwies. Nach Behandlung der Zellen mit 2,0 µg BrdU/ml fand er 0,60 SCE pro Ring. Hochgerechnet auf die Gesamtlänge der Chromosomen, ergaben sich 5,25 SCE pro Zelle pro zwei Zellzyklen, so daß SUTOU (1981) den Effekt dieser Konzentration an BrdU auf die Induktion von SCE auf 1,14 SCE pro Zelle pro 2 Zellzyklen bezifferte. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch MORGAN *et al.* (1986). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen von NATARAJAN *et al.* (1986) überein und sprechen für ein spontanes Vorkommen von SCE.

Einen interessanten Hinweis auf die Existenz spontaner SCE fanden PATKIN *et al.* (1994) in Embryozellen der Maus, die im 32-Zellstadium eine spontane Schwesterchromatiden-differenzierung nach modifizierter differentieller Färbung zeigten. Die Differenzierung beruht vermutlich auf asymmetrischen Methylierungsmustern der Schwesterchromatiden infolge der Aktivitätsabnahme der DNS-Methyltransferase ab dem 8-Zellstadium. In diesen Mitosen wurden etwa 9 SCE pro Zelle gefunden.

1.2.5 Induktion von SCE

Schon bald nach der Einführung der FPG-Technik stellten PERRY und EVANS (1975) den SCE-Test als Methode zur Mutagenitätsforschung vor. Die Autoren behandelten CHO-Zellen mit 15 verschiedenen Mutagenen, wie zum Beispiel Röntgenstrahlen, Bleomycin, den alkylierenden Substanzen Ethylmethansulfonat, das eine Ethylgruppe auf die DNS übertragen kann, und MMC, das zwei Alkylgruppen besitzt. Alle Agenzien waren dafür bekannt, CA zu induzieren. Mit Ausnahme des Bleomycins und ionisierender Strahlung führten alle getesteten Agenzien zu einer Verdopplung der Anzahl von SCE pro Zelle gegenüber der Kontrolle bei Dosen, die noch keine signifikante Erhöhung von CA induzierten. PERRY und EVANS (1975) stuften Bleomycin und Röntgenstrahlen als schwache SCE-Induktoren ein, denn die zur Verdopplung der SCE-Frequenzen notwendigen Dosen führten bereits zu einer deutlichen Erhöhung von CA.

Die Sensitivität des SCE-Tests wurde in zahlreichen Experimenten bestätigt und führte zur Entwicklung standardisierter Testprotokolle (BEEK und OBE 1975, LATT *et al.* 1981, GALLOWAY *et al.* 1985, TUCKER *et al.* 1993). Gemeinsames Kennzeichen dieser SCE-Tests

ist, daß die Behandlung mit dem Testagens an nicht-substituierten Zellen erfolgt und daß erst nachfolgend BrdU zugesetzt wird. Somit werden die zweiten Mitosen nach Behandlungsbeginn auf SCE untersucht. Ein positives Ergebnis im SCE-Test deutet im allgemeinen darauf hin, daß das Agens mutagen und karzinogen wirkt. Insbesondere S-Phase-abhängige Mutagene, die zur Ausprägung von CA der Replikation bedürfen, erhöhen erheblich die Anzahl der SCE pro Zelle. Zu diesen Agenzien gehören Alkylanzien, DNS-Basenanaloga und Substanzen, die Einzelstrangbrüche in der DNS induzieren (LATT *et al.* 1981). Ein negatives Ergebnis schließt die mutagene und karzinogene Wirkung eines Agens jedoch nicht aus. Bei der Untersuchung von potentiellen Karzinogenen muß der SCE-Test daher mit weiteren Tests ergänzt werden. Die Substanz sollte auf ihre Fähigkeit zur Induktion von CA, irregulärer DNS-Synthese und DNS-Reparatur sowie auf *in vitro*-Transformation untersucht werden (SANDBERG und BLOCK 1988).

Die SCE-induzierende Wirkung von Agenzien, die DSB verursachen und damit S-Phase-unabhängig zu CA führen, ist umstritten (zusammengefaßt in SCHUNCK 1997). Zu den S-Phase-unabhängigen Mutagenen gehören ionisierende Strahlung, einschließlich Röntgenstrahlung (SAX 1938, BENDER *et al.* 1974), die in der Wirkung den ionisierenden Strahlen ähnelnden Radiomimetika Bleomycin (POVIRK und AUSTIN 1991) und Neocarzinostatin (AU *et al.* 1984, Goldberg 1991), sowie Restriktionsendonukleasen (NATARAJAN und OBE 1984, OBE und WINKEL 1985, OBE *et al.* 1985). Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die der Inaktivierung artfremder DNS dienen, indem sie doppelsträngige DNS an spezifischen Basensequenzen entweder mit glatten oder überhängenden Termini schneiden (PINGOUD *et al.* 1993). Im Gegensatz zu ionisierender Strahlung oder radiomimetischen Chemikalien erzeugen Restriktionsendonukleasen ausschließlich DSB. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen konnte die zentrale Bedeutung des DSB für die Entstehung von CA belegt werden (BRYANT 1990, OBE *et al.* 1992).

Bei Durchführung des SCE-Tests in oben beschriebener Form wurden S-Phase-unabhängige Mutagene als sehr schwache SCE-Induktoren klassifiziert. Röntgen- oder γ -Bestrahlung von Lymphozyten in der G0-Phase führte nicht zur Erhöhung der SCE-Frequenz (LITTLEFIELD *et al.* 1979, MORGAN und CROSSEN 1980). Bleomycin wurde bereits von PERRY und EVANS (1975) als schwacher SCE-Induktor eingestuft. Nach Behandlung von CHO-Zellen mit Neocarzinostatin wurde ebenfalls kein Anstieg in der SCE-Frequenz festgestellt (AU *et al.* 1984).

Diese Ergebnisse können jedoch nicht kritiklos hingenommen werden, im Gegenteil erscheint das Konzept des SCE-Tests vor dem Hintergrund problematisch, daß die Auswertung an zweiten Nachbehandlungsmitosen erfolgt, die von schwer geschädigten Zellen unter Umständen gar nicht erreicht werden. Diese Überlegungen führten zu einer Abänderung des experimentellen Aufbaus. In dem Zellzyklus vor der Behandlung mit dem Testagens wurden die Zellen mit BrdU markiert, so daß erste Nachbehandlungsmitosen differentiell gefärbt und auf SCE analysiert werden konnten (NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN 1981). Bei einer Behandlung von unifilar BrdU-substituierten Zellen in der G1-Phase konnte eine Erhöhung der SCE-Frequenzen für viele S-Phase-unabhängige Mutagenen nachgewiesen werden, unter anderem für Röntgenstrahlen (PERRY und EVANS 1975), Bleomycin (OBE *et al.* 1994), Neocarzinostatin (SCHUNCK und OBE 1995) und verschiedenen Restriktionsendonukleasen (NATARAJAN *et al.* 1985, FOLLE *et al.* 1992, BALAJEE und NATARAJAN 1993, ORTIZ *et al.* 1996).

Aber auch dieser experimentelle Ansatz ist nicht frei von Kritik. Insbesondere bezüglich ionisierender Bestrahlung kann mit dieser Versuchsanordnung der Einfluß des BrdU auf die Induktion von SCE nicht abgeschätzt werden. Bestrahlung von BrdU-substituierter DNS führt verstärkt zur Radikalbildung im Uracilyl-Rest nach Debromination (MORRIS 1991). Das Uracil-Radikal kann der Hydroxylbindung am C4-Atom der Desoxyribose ein Wasserstoff-Atom entziehen. Die Reaktionskette kann über die Öffnung des Zuckerrings im Strangbruch enden (SCHULTE-FROHLINDE 1990).

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der beiden Teststrategien zur Untersuchung von SCE nach Behandlung mit S-Phase-unabhängigen Mutagenen bestand ein großer Erklärungsbedarf. In bezug auf ionisierende Strahlen führte dies zu der Hypothese von MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995), daß Röntgen- und γ -Strahlen keine „echten“ SCE induzieren, sondern daß die beobachteten SCE Folge von CA, insbesondere von Inversionen, und somit „falsche“ SCE seien.

1.2.6 Die Hypothese der „falschen“ SCE nach γ - oder Röntgenbestrahlung

Röntgen- und γ -Strahlen gehören aufgrund ihrer Fähigkeit zur Induktion von DSB zu den S-Phase-unabhängigen Mutagenen. Die Induktion von DSB in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus führt zu unterschiedlichen Typen von CA. Wenn das Bruchereignis in der G1-Phase stattfindet, wird der Schaden in der S-Phase dupliziert. In der nachfolgenden

Metaphase weisen daher beide Chromatiden des Chromosoms die Veränderung an der gleichen Stelle auf. Diese CA werden Chromosomentypaberrationen (CSA) genannt. Im folgenden sollen einige häufig nachweisbare und im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wichtige CSA vorgestellt werden:

- Ringchromosomen mit oder ohne Zentromer in verschiedenen Größen, deren Kleinstformen als *double minutes* (DM) bezeichnet werden, können aus einem interstitiellen Fragment nach zwei DSB in einem Chromosom gebildet werden.
- Inversionen entstehen, wenn ein interstitielles Fragment unter Beachtung der Antiparallelität der DNS, um 180° gedreht, in dasselbe Chromosom eingebaut wird. Ohne spezifische Nachweismethoden sind Inversionen nicht erkennbar.
- Dizentrische Chromosomen (DIZ) sind das Ergebnis eines asymmetrischen Austausches nach jeweils einem Bruch in zwei Chromosomen. Dem DIZ kann häufig ein reuniertes Fragment zugeordnet werden.
- Reziproke Translokationen, in denen jeweils ein zentromerloses Fragment ausgetauscht wurde, stellen das symmetrische Gegenstück zu dizentrischen Chromosomen dar. Ihr Nachweis ist nur mit spezifischen Färbemethoden möglich.

In replizierten Abschnitten eines Chromosoms in der S-Phase und in der G2-Phase können die Chromatiden unabhängig voneinander geschädigt werden. Diese CA werden als Chromatidentypaberrationen (CTA) bezeichnet. Aufgrund der Schwesterchromatidenpaarung im Metaphasechromosom kommt es zu charakteristischen Austauschfiguren (Savage 1976).

S-Phase-abhängige Mutagene können hingegen nicht selbständig DSB induzieren und bedürfen zur Ausprägung von CA der S-Phase. Bei Applikation in der G1-Phase werden in der folgenden Mitose CTA gefunden.

Wenn unifilar markierte Chromosomen in der G1-Phase γ - oder röntgenbestrahlt werden, können CSA entstehen, in denen markierte und unmarkierte DNS-Einzelstränge rekombiniert werden. Diese Verknüpfung zeigt sich in der folgenden Mitose als SCE. Den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit gehorchend, müssen daher die Hälfte aller DIZ und die Hälfte aller reziproken Translokationen SCE an den Fusionsstellen aufweisen. Unter der Voraussetzung, daß DIZ und reziproke Translokationen gleich häufig auftreten, kann ein DIZ mit einem SCE gleichgesetzt werden. In Inversionen wird ein interstitielles Fragment umgedreht eingebaut. Aus dieser Konstellation ergeben sich nach der S-Phase zwei SCE.

Unter der Annahme, daß die Häufigkeit der Inversionen einerseits, der Ringchromosomen und DM (RDM) andererseits übereinstimmt, können für jeden RDM zwei SCE berechnet werden. Die hier diskutierten SCE sind jedoch nicht als Ereignisse der S-Phase anzusehen, sondern als „falsche“ SCE infolge der Bildung von CA.

Erstmals wurde eine solche Korrelation von SCE und CA 1974 von WOLFF *et al.* angenommen. Sie markierten CHO-Zellen unifilar mit ^3H -Desoxythymidin und bestrahlten sie mit 0,75 oder 1,5 Gy Röntgenstrahlen. Die leichte Erhöhung der SCE-Frequenz ließ sich annähernd vollständig über die induzierten CA erklären.

Mit einem besonderen Detailreichtum führten MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) ähnliche Berechnungen für Versuche durch, in denen unifilar BrdU-substituierte menschliche Fibroblasten mit γ -Strahlen zwischen 0 und 7 Gy behandelt wurden. Die Autoren unterschieden paarweise in einem Chromosom vorkommende interne SCE, die mit Inversionen gleichgesetzt wurden, von einzelnen terminalen SCE, die als Folge von Translokationen betrachtet wurden. In diesen Versuchen fanden MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) verstärkt einen Anstieg der internen SCE, der sich gut mit der berechneten Anzahl an Inversionen in Deckung bringen ließ. Die geringe Erhöhung der terminalen SCE konnte ebenfalls vollständig über die zugrunde gelegten Translokationen erklärt werden. Als Kontrolle für diese Versuche führten MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) ein Experiment im Sinne des klassischen SCE-Tests durch, der die Ergebnisse von LITTLEFIELD *et al.* (1979) und MORGAN und CROSSEN (1980) bestätigte, daß γ -Strahlen keine SCE induzieren. Aus ihren Ergebnissen folgerten MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995), daß die nach γ -Bestrahlung von unifilar BrdU-substituierten Zellen zu beobachtenden SCE „falsch“ sind, weil sie auf CA, insbesondere auf Inversionen, beruhen.

Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse von MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) fällt jedoch auf, daß die Anzahl der strahleninduzierten SCE sehr klein ist. Bei einem Kontrollniveau von etwa 4,8 SCE pro Zelle wurden nach der γ -Bestrahlung mit 7 Gy im Durchschnitt 6,85 SCE pro Zelle gefunden. Die Dosis von 7 Gy induzierte in unifilar BrdU-substituierten menschlichen Fibroblasten demnach lediglich zwei SCE pro Zelle.

Diese Ergebnisse stimmen nicht mit der von PERRY und EVANS (1975) veröffentlichten Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung von unifilar BrdU-substituierten CHO-Zellen überein. Bei einem Kontrollniveau von ungefähr 12 SCE pro

Zelle wurden nach 4 Gy Röntgenbestrahlung etwa 20 SCE, nach 8 Gy etwa 27 SCE pro Zelle gefunden (PERRY und EVANS 1975).

In dieser Arbeit werden Versuche vorgestellt, die zeigen, daß nur ein geringer Anteil der in unifilar BrdU-substituierten CHO-Zellen mit Röntgenstrahlen induzierten SCE über CA erklärt werden kann.

1.2.7 Endoreduplikationen (ER)

Endoreduplikationen (ER) wurden in tierischen Zellen erstmals von LEVAN und HAUSCHKA (1953) beschrieben und als eine besondere Form der Chromosomenverdopplung definiert, in der eine zusätzliche Replikation der Chromosomen erfolgt, ohne daß eine Mitose stattgefunden hat. Das cytologische Merkmal der ER ist die auffällige Parallelanordnung der duplizierten Chromosomen als Diplochromosomen. Zunächst wurde angenommen, daß diese Anordnung auf einer Reduplikation der Chromatiden ohne Verdopplung des Zentromers beruhte. Die Konsequenz wäre ein Chromosom mit vier Chromatiden (KING 1972, OKSALA und THERMAN 1974). Dies konnte nach gezielter lichtmikroskopischer Analyse, insbesondere von endoreduplizierten DM, die auch ohne Zentromer aneinanderhafteten (TAKAYAMA *et al.* 1992), und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie widerlegt werden (GOYANES und SCHVARTZMAN 1981). GOYANES und SCHVARTZMAN (1981) konnten elektronenmikroskopisch nachweisen, daß jedes Schwesterchromosom eines Diplochromosoms ein eigenes Zentromer besitzt. Die Autoren beobachteten schlingenförmige Verknüpfungen aus Chromatinfasern sowohl zwischen den Schwesterchromatiden eines Chromosoms als auch zwischen den benachbarten Chromatiden der beiden Schwesterchromosomen, deren Häufigkeit bei Zunahme des Kondensationsgrades von Prophase zu Metaphase abnahm. Die strukturelle Grundlage der Parallelanordnung der Diplochromosomen scheint also auf ähnlichen Mechanismen zu beruhen wie die Schwesterchromatidenpaarung.

ER können sowohl spontan als auch nach Behandlung mit physikalischen Agenzien, beispielsweise α -Strahlung (LÜCKE-HUHLE 1983) oder Chemikalien, wie zum Beispiel Colchicin (RIZZONI und PALITTI 1973, MESCHINI *et al.* 1996), 4-Nitrochinolin-1-oxid (MATSUMOTO und OHTA 1995), Hydrazin (SPEIT *et al.* 1984), Cytosinarabinosid (BAN *et al.* 1983), Vincristin (TAKANARI *et al.* 1985, 1991) und Rotenon (MATSUMOTO und OHTA 1991, 1992, 1995, WOLFF und AFZAL 1996) induziert werden. Mit Ausnahme des

Rotenons liegt der Zeitpunkt der Induktion der ER mit den genannten Agenzien höchstwahrscheinlich in der S- oder der G2-Phase. Rotenon induziert ER dagegen ausschließlich während der Metaphase der Mitose (MATSUMOTO und OHTA 1992, 1995).

Das auch in dieser Arbeit verwendete Rotenon eignet sich besonders gut zur Induktion von ER für cytogenetische Untersuchungen, weil es selbst keine CA und SCE induziert (GUADANAÑO *et al.* 1998). Rotenon ist ein pflanzliches Insektizid und hemmt den Elektronentransport von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Ubichinon in der Atmungskette (FUKAMI *et al.* 1967).

Eine weitere Besonderheit der Diplochromosomen wurde sichtbar nach Substitution der Chromosomen mit ^3H -Desoxythymidin in der S-Phase vor Induktion der ER und Analyse der Diplochromosomen nach einer weiteren S-Phase ohne Markierung (WALEN 1965, SCHWARZACHER und SCHNEDL 1966, SCHNEDL 1967). Beide Chromosomen eines Diplochromosoms waren nach einer solchen Behandlung differentiell markiert, das ^3H -Desoxythymidin war regelmäßig in den beiden äußeren Chromatiden nachweisbar. Ausnahmen dieser Anordnung waren immer gekoppelt mit einem SCE-Ereignis. Ein analoges Ergebnis beobachteten WOLFF und PERRY (1974) nach BrdU-Substitution in beiden S-Phasen und FPG-Färbung. Die bifilar BrdU-markierten, hell gefärbten Chromatiden lagen regelmäßig außen, die unifilar substituierten, dunklen Chromatiden innen im Diplochromosom. Aus diesem Muster lassen sich Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus der Replikation ziehen. Der neusynthetisierte DNS-Einzelstrang wird stets, vereinfacht und bildhaft gesprochen, nach „außen“ angelegt.

Möglicherweise ist die plane Anordnung der Diplochromosomen aber ein präparatives Artefakt, das sich aus der Spreitung der Chromosomen auf dem Objektträger ergibt. Präzise Beobachtungen von doppelt endoreduplizierten Metaphasen mit quadruplen Chromosomen, die aus zwei Diplochromosomen bestehen, liefern Hinweise darauf, daß die Anordnung in der lebenden Zelle dreidimensional ist. Unterschiedlich starke Bindungen zwischen den verschiedenen Chromatiden zwingen die Diplochromosomen während der Präparation in ihre spezifische zweidimensionale Lage (TAKANARI 1985, MATSUMOTO und OHTA 1994).

Differentiell gefärbte ER erlauben eine Zuordnung der SCE zu dem Zellzyklus, in dem sie entstanden. Die von TAYLOR (1958) nach Untersuchungen von SCE in tetraploiden Zellen geprägten Begriffe *Twin*- und *Single*-SCE lassen sich sehr gut auf Diplochromosomen mit zwei differentiell gefärbten Chromosomen anwenden. Die SCE des ersten Zellzyklus liegen aufgrund der Replikation als *Twin*-SCE vor, nämlich doppelt und an gleicher Position in

beiden Schwesterchromosomen. SCE des zweiten Zellzyklus betreffen dagegen nur ein Chromosom und werden *Single*-SCE genannt.

Wenn vor Induktion der ER zwei S-Phasen lang BrdU angeboten und der endoreduplikative Zellzyklus in Abwesenheit von BrdU durchlaufen wird, enthalten die Diplochromosomen je ein differentiell und ein hell gefärbtes Chromosom. Die dunkle Chromatide des differentiell gefärbten Chromosoms liegt im Regelfall innen. SCE-Ereignisse können bei diesem Versuchsschema theoretisch über drei Zellzyklen hinweg getrennt betrachtet werden (MESCHINI *et al.* 1996, WOLFF und AFZAL 1996). Für die Zuordnung eines SCE zum jeweiligen Zellzyklus ist die Position des dunklen Chromatidensegments innerhalb des Diplochromosoms entscheidend. Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen der drei Typen von SCE erfolgt in Anlehnung an die Terminologie von WOLFF und AFZAL (1996). SCE des ersten und zweiten Zellzyklus zeigen einen Austausch des dunklen Chromatidensegments in das ansonsten helle Chromosom. Sie werden *Between-Chromosome-Exchanges* (BCE) genannt. Erfolgt der Farbwechsel zur inneren Chromatide des überwiegend hellen Chromosoms, wird er als *inner-inner BCE* bezeichnet. Ein solches SCE kann dem ersten Zellzyklus zugeordnet werden. Ein SCE des zweiten Zellzyklus stellt sich als Farbwechsel zur äußeren Chromatide des vornehmlich hellen Chromosoms dar und wird *inner-outer BCE* benannt. SCE des dritten Zellzyklus entsprechen typischen SCE und betreffen nur eines der beiden Chromosomen.

1.2.7.1 Nutzung des Systems der ER für Experimente dieser Arbeit

Die von MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) aufgestellte These, daß ionisierende Strahlen überwiegend „falsche“ SCE aufgrund von CA, insbesondere von Inversionen, erzeugen, kann nur bewiesen oder widerlegt werden, wenn „falsche“ SCE von „echten“, S-Phase-abhängigen SCE unterschieden werden können. Das System der ER ermöglicht nicht nur eine Zuordnung der SCE zu dem Zellzyklus, in der ein SCE entstanden ist, sondern es kann in spezifischer Weise zur Klärung der Frage benutzt werden, ob SCE nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase in Abhängigkeit von der S-Phase entstehen.

Der experimentelle Aufbau und die zugrunde liegenden Hypothesen sind in Abb. 3 erläutert. Unsubstituierte Chromosomen werden in der G1-Phase bestrahlt, erst in der nächsten S-Phase erfolgt die Markierung mit BrdU. Die nachfolgende Mitose wird mit Rotenon blockiert, und ER wird induziert (↗BT-ER).

Hypothese A geht von der Induktion strahleninduzierter S-Phase-abhängiger Läsionen aus, die in der nächsten S-Phase zur Ausprägung von SCE führen. Diese SCE sind in der folgenden Mitose noch nicht sichtbar. Im Schema kann verfolgt werden, wie aus einer solchen Läsion ein *Twin*-SCE hervorgeht. Hypothese B beschreibt die Reparatur des strahleninduzierten Schadens in Form von CA am Beispiel einer Inversion. Weil zum Zeitpunkt der Bestrahlung noch keine Substitution mit BrdU stattgefunden hat, können CA nicht zur Ausprägung von *Twin*-SCE führen.

Zur Kontrolle wird der experimentelle Aufbau für einen zweiten Versuchskomplex so abgewandelt, daß sowohl „echte“ als auch „falsche“ SCE sichtbar werden. Die Zellen werden eine S-Phase lang mit BrdU vormarkiert, die Bestrahlung erfolgt in der zweiten G1-Phase, die zweite S-Phase läuft ebenfalls in Gegenwart von BrdU ab, und in der zweiten Mitose wird mit Rotenon ER induziert (B \nleftrightarrow BT-ER). In der nachfolgenden endoreduplizierten Metaphase erscheinen nicht nur die strahleninduzierten S-Phase-abhängigen SCE als BCE in den Diplochromosomen, sondern auch die „falschen“ SCE infolge von CA, in denen BrdU-haltige mit unsubstituierten DNS-Einzelstrangabschnitten verknüpft wurden. Wie in Abb. 4 dargestellt, unterscheiden sich die „echten“ SCE des zweiten Zellzyklus als *inner-outer BCE* von den „falschen“ SCE als Begleiterscheinung der CA, die sich als *inner-inner BCE* präsentieren. Aufgrund der häufigen Verdrillung der Diplochromosomen im mikroskopischen Präparat wurde in der Auswertung der Versuche jedoch auf eine Unterscheidung der beiden Typen von BCE verzichtet.

Die Schemata der Abb. 3 und 4 beziehen sich nur auf strahleninduzierte SCE, spontan auftretende SCE werden nicht dargestellt. Es wird davon ausgegangen, daß die strahleninduzierten Schäden im wesentlichen nur im ersten Zellzyklus nach der Behandlung zur Bildung von SCE beitragen, daher werden in Abb. 3 die *Single*-SCE, die dem zweiten Zellzyklus zugeordnet werden, und in Abb. 4 die SCE des dritten Zellzyklus nicht berücksichtigt.

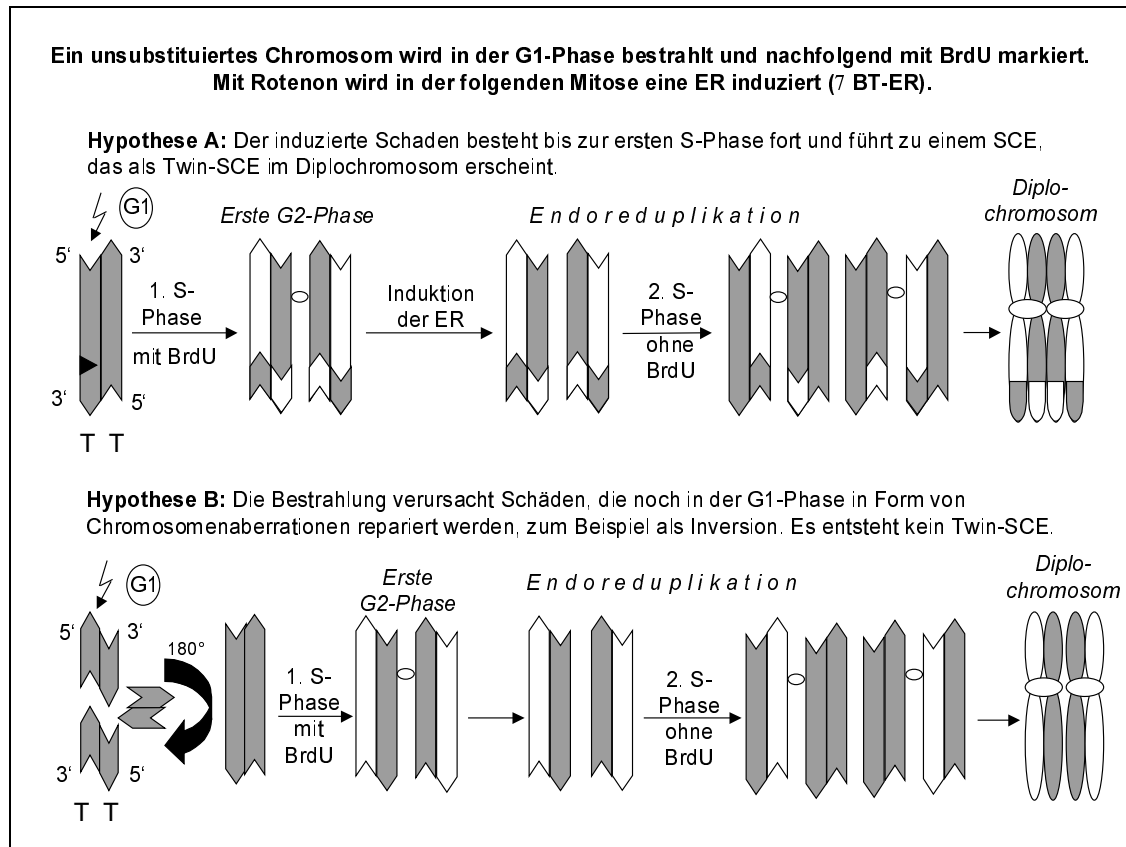


Abb. 3: Darstellung der Entstehung von *Twin-SCE* aufgrund S-Phase-abhängiger Läsionen, aber nicht als Folge von CA nach Bestrahlung von unsubstituierten Chromosomen in der G1-Phase, Markierung der nächsten S-Phase mit BrdU und Induktion der ER mit Rotenon (\nrightarrow BT-ER). Der gezackte Pfeil zeigt den Bestrahlungszeitpunkt an, eine langlebige Läsion ist mit einem schwarzen Dreieck angedeutet. Darstellung wie in Abb. 2.

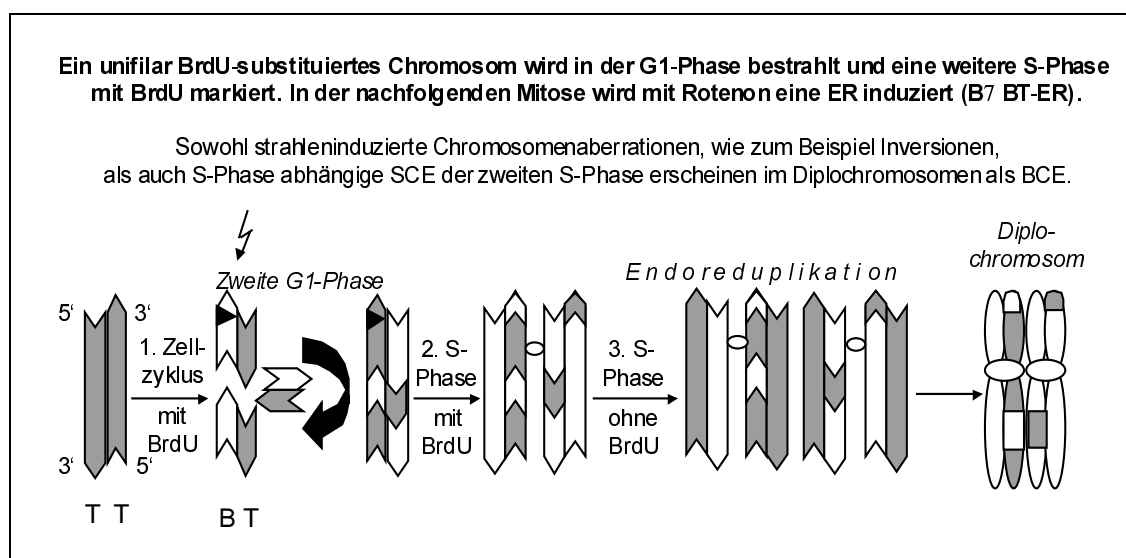


Abb. 4: Darstellung der Entstehung von BCE aufgrund S-Phase-abhängiger Läsionen und als Folge von CA nach Bestrahlung von unifilar BrdU-substituierten Chromosomen in der G1-Phase, einer weiteren S-Phase mit BrdU und Induktion der ER mit Rotenon (B \nrightarrow BT-ER). Der gezackte Pfeil zeigt den Bestrahlungszeitpunkt an, das schwarze Dreieck eine langlebige Läsion. Darstellung wie in Abb. 2.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Bis heute sind die molekularen Mechanismen der Bildung von SCE nicht bekannt. SCE werden als Ereignisse der S-Phase angesehen, denn wegen der Antiparallelität der DNS sind zu einem Austausch zwei DNS-Doppelstränge notwendig. SCE können aber auch entstehen, wenn bei der Reparatur von DSB BrdU-substituierte mit unsubstituierten DNS-Einzelsträngen verknüpft werden und nachfolgend eine S-Phase durchlaufen wird. Somit können auch CA zu SCE führen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der jeweiligen Anteile an SCE, die nach Röntgenbestrahlung entweder S-Phase-abhängig oder als Folge von CA entstanden. Folgende Versuche wurden an CHO-Zellen durchgeführt:

1. Erstellung einer Dosis-Effekt-Beziehung für SCE und RDM nach Bestrahlung von unifilar BrdU-substituierten Zellen. Es wurde untersucht, ob und wie RDM mit SCE korrelieren.
2. SCE-Analyse nach Bestrahlung in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus.
3. Zur Untersuchung der Induktion von SCE in der G2-Phase wurden die Zellen mit BrdU präinkubiert, nach Bestrahlung mit Colcemid behandelt und erholt. Die Häufigkeit der SCE wurde in tetraploiden Zellen bestimmt, die in der G2-Phase bestrahlt und aufgrund der Behandlung mit Colcemid tetraploid geworden waren.
4. Mit Hilfe von ER konnte bestimmt werden, in welchem Zellzyklus SCE nach Bestrahlung entstanden waren. Bestrahlung von unsubstituierten Zellen, nachfolgende Markierung mit BrdU und Induktion von ER erlaubte zusätzlich die Untersuchung des Anteils an SCE, der auf S-Phase-abhängigen Schäden beruhte.

Weil der SCE-Test routinemäßig in der Mutagenitätsforschung eingesetzt wird, ist die Kenntnis über den Einfluß von BrdU auf die Entstehung von SCE von größter Bedeutung. BrdU neigt insbesondere unter ionisierender Bestrahlung zur radikalen Dissoziation. Der Einsatz eines Substituenten, der keine Radikalisierung zeigt, wäre somit vorteilhaft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Darstellung von SCE mit Biotin-dUTP entwickelt. Der Vergleich strahleninduzierter SCE-Frequenzen nach Substitution mit BrdU oder mit Biotin-dUTP gab Aufschluß über die BrdU-abhängige Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen.

Ein möglicher Einfluß des BrdU auf die Induktion von SCE wurde vergleichend auch nach Behandlung mit dem S-Phase-abhängigen Mutagen MMC untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Sterile Arbeitsbedingungen

Voraussetzung für die Arbeit mit Säugerzellen in Kultur ist der sterile Umgang mit den Zellen. Aus diesem Grund wird in einem Sterilraum unter einer Sterilbank gearbeitet, die vor und nach Gebrauch mit der Desinfizierlösung Melsept abgerieben wird. Petrischalen und andere Einmalartikel werden vom Hersteller steril geliefert. Glasgeräte werden in einem Trockenschrank bei 180 °C zweimal sterilisiert. Hitzeempfindliche Materialien, wie zum Beispiel Kunststoffpipettenspitzen, werden bei 120 °C und 1 bar Druck 50 min lang autoklaviert. Alle Lösungen, wie beispielsweise Medium, werden entweder vom Hersteller steril geliefert oder durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,1 µm, der auch Mykoplasmen zurückhält, filtriert.

2.2 Zellkultur

In allen Experimenten wurden Zellen der permanenten Zelllinie CHO-9 eingesetzt. Die CHO-Zelllinie entstand aus einer 1957 angelegten primären Zellkultur von Fibroblasten des Eierstocks eines Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) nach spontaner Transformation (TIJO und PUCK 1958, PUCK 1985). Diese Transformation ging mit chromosomalen Veränderungen einher. Die Zellen enthalten 21 statt 22 Chromosomen, von denen nur 9 dem ursprünglichen Chromosomensatz entsprechen: je ein Chromosom 1, 2, 5, 7, 9, 10, X und die beiden Chromosomen 8. Die 12 veränderten Chromosomen entstanden hauptsächlich durch Translokationen und Inversionen und werden als Z-Chromosomen bezeichnet (KAO und PUCK 1969, SICILIANO *et al.* 1985). Eine ausführliche Beschreibung der CHO-9 Chromosomen findet sich in FOLLE *et al.* (1997). Mit diesem niedrigen, relativ stabilen Chromosomensatz sind CHO-Zellen gut geeignet für cytogenetische Analysen.

Aufgrund eines Enzymdefekts können CHO-Zellen die Aminosäure Prolin nicht selbst herstellen, so daß Prolin im Nährmedium angeboten werden muß (GOTTESMAN 1985).

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Der pH-Wert des Kulturmediums sollte zwischen 7,0 und 8,2 liegen. Das Kulturmedium besteht aus McCoy's 5A-Medium, einschließlich 125 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 Einheiten/ml Penicillin, dem 10 % fötales Kälberserum (FKS)

zugemischt werden. Dieses Gemisch wird im folgenden als Vollmedium bezeichnet, der Begriff Medium bezieht sich auf das serumfreie McCoy's 5A Medium.

CHO-Zellen sind sehr widerstandsfähig und können zur Vorratshaltung bei -80 °C in einem speziellen Einfriermedium aus 20 % FKS/10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Medium eingefroren werden.

CHO-Zellen wachsen als einschichtige Zelllage (*Monolayer*) auf einer geeigneten Unterlage, zum Beispiel auf dem Boden einer Gewebekulturschale. Lebende Interphasezellen haben eine spindelförmige Morphologie und haften relativ fest am Untergrund, Mitosezellen runden sich dagegen ab und können mit leichtem Schütteln von der Unterlage abgelöst werden. Unter optimalen Kulturbedingungen befinden sich die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase und teilen sich alle 12 bis 14 Stunden. Wenn die Zellen den zur Verfügung stehenden Boden der Kulturschale ausgefüllt haben, stellen sie das Wachstum aufgrund von Kontaktinhibition ein. Deshalb muß die Zellkultur alle zwei bis drei Tage ausgedünnt und mit frischem Medium versorgt werden. Nach etwa 40 Passagen werden die Stammkulturen verworfen und mit frisch aufgetauten Zellen ersetzt.

Das Passagieren der CHO-Zellen umfaßt folgende Arbeitsschritte:

Für das Passagieren der Zellen werden alle benötigten Lösungen auf 37 °C vorgewärmt.

1. Abgießen des Kulturmediums und Spülen der Schalen mit etwa 4 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung ohne Calcium- und Magnesium-Ionen (*phosphate buffered saline*, PBS) mit folgender Zusammensetzung:

8000 mg/l NaCl

200 mg/l KCl

1150 mg/l Na₂HPO₄

200 mg/l KH₂PO₄ in *Aqua dest.*

2. Vorsichtiges Übersichten des Schalenbodens mit etwa 2 ml einer Trypsinlösung aus 0,05 % Trypsin, 0,02 % Ethylen-diamin-tetraacetat (EDTA) in PBS, Abgießen des Überstands, Einwirkdauer 2 bis 3 Minuten
3. Nach beginnender Ablösung der Zellen vom Boden Abstoppen der Trypsinwirkung mit 2 ml Medium

4. Mehrmaliges kräftiges Spülen mit einer Pasteurpipette zum vollständigen Ablösen und Vereinzeln der Zellen
5. Aussäen von etwa 300 µl Zellsuspension in vorbereitete 96 mm Petrischalen mit 10 ml Vollmedium

2.3 Methoden der Zellbehandlung

Alle Versuchsschritte wurden - soweit nicht anders vermerkt - bei Raumtemperatur und unter Verwendung auf 37 °C vorgewärmter Lösungen durchgeführt. Erholungszeiten und Inkubationsphasen, die im Text nicht näher spezifiziert werden, erfolgten im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.3.1 Markierung der CHO-Zellen mit BrdU oder Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-dUTP)

Voraussetzung für die differentielle Färbung von Schwesterchromatiden ist die Inkorporation eines identifizierbaren Basenanalogs in die DNS in der vorletzten S-Phase vor der Fixierung. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck BrdU und Biotin-dUTP verwendet. Die Versuchsplanung mit dem Angebot von BrdU oder Biotin-dUTP in der ersten, aber nicht in der zweiten S-Phase führt zu folgender Differenzierung: Eine Chromatide enthält jeweils einen substituierten und einen unsubstituierten DNS-Einzelstrang, die andere Chromatide ist nicht markiert.

2.3.1.1 Markierung der CHO-Zellen mit BrdU

Je nach Versuchsplan wurden die Zellkulturen 14 oder 18 h mit 0,5 µM oder 20 µM BrdU präinkubiert:

1. Abgießen des Kulturmediums, Spülen mit PBS, Trypsinieren und Zugabe von 2 ml Medium, wie unter Passagieren der Zellen beschrieben
2. Resuspension der Zellen und Überführung in ein Zentrifugenröhrchen
3. Zentrifugation bei 120 g für 5 min, Absaugen des Überstands, Waschen mit 5 ml Medium, Zentrifugation und Absaugen des Überstands
4. Resuspension des Pellets in 1 ml Medium
5. Aussäen von je 250 µl der Zellsuspension in vorbereitete 60 mm Petrischalen mit 5 ml Vollmedium, einschließlich 0,5 µM oder 20 µM BrdU

6. Inkubation für 14 oder 18 h
7. Abgießen des BrdU-haltigen Kulturmediums, zweimaliges Waschen mit 5 ml Medium, Zusatz von 5 ml Vollmedium ohne BrdU

2.3.1.2 Permeabilisierung der Zellen für Biotin-dUTP mit Hilfe der Elektroporation

Biotin-dUTP kann aufgrund des stark negativ geladenen Triphosphats die Zellmembran nicht frei passieren. Eine effiziente Methode zur Permeabilisierung ist die Elektroporation (CHANG *et al.* 1992, WINEGAR *et al.* 1989). Mit einem kurzen, definierten elektrischen Puls wird die Zellmembran lokal destabilisiert und durchlässig für große Moleküle.

Für die Elektroporation werden 800 µl Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 4 mm verwendet. Mit einem Kondensator wird eine Spannung von 400 V angelegt. Das elektrische Feld, in dem sich die Zellen befinden, hat daher eine Stärke von 1000 V/cm (Spannung/Abstand der Elektroden).

Eine Entladungszeit von etwa 5 ms hat sich für das Einbringen von Fremdstoffen in Zellen als günstig erwiesen. Die Entladungszeit τ entspricht der Zeit, in der die Spannung auf etwa 37 % des Eingangswerts gefallen ist. Sie läßt sich aus dem Produkt von Widerstand und Kapazität des Kondensators berechnen. In der Praxis hat sich der Einsatz einer gepufferten Saccharoselösung mit relativ hohem Widerstand bei einer Kapazität des Kondensators von 25 µF bewährt. Die Zellen werden für die Elektroporation in 800 µl Saccharosepuffer mit folgender Zusammensetzung suspendiert:

- 272 mM Saccharose
- 7 mM KH_2PO_4 , pH=7,4
- 1 mM MgCl_2

Die Elektroporation umfaßt folgende Arbeitsschritte:

Für zwei Versuchspunkte wird eine nahezu vollbewachsene 96 mm Petrischale eingesetzt.

1. Absaugen des Kulturmediums und Waschen des *Monolayers* mit PBS
2. Trypsinieren der Zellen, Resuspension in Medium und Überführung in ein Zentrifugenröhrchen
3. Zentrifugation bei 120 g für 5 min
4. Verwerfen des Überstands, Waschen der Zellen mit 5 ml Saccharosepuffer

5. Zentrifugation und Absaugen des Überstands
6. Zugabe von 800 µl Saccharose-Behandlungslösung einschließlich 20 µM Biotin-dUTP und 20 µM Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP), gründliche Durchmischung und Überführung der Zellsuspension in die Elektroporationsküvette
7. Elektroporation bei 400 V, 25 µF
8. Erholung der Zellen in der Küvette für 15 min bei Raumtemperatur
9. Überführung der Zellen aus der Küvette in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium, Zentrifugation und Verwerfen des Überstands
10. Aussäen der Zellen in zwei 60 mm Petrischalen mit 5 ml Vollmedium und Inkubation für 14 h

2.3.2 Röntgenbestrahlung

Die Zellen wurden als *Monolayer* in der Kulturschale mit Vollmedium in einer geschlossenen Röntgenbestrahlungseinheit mit 130 kV, einem 2,5 mm Aluminium-Filter und einer Dosis-Leistung von 1,2 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt.

2.3.3 Behandlung mit Mitomycin C (MMC)

Eine Stammlösung mit 10 µM MMC in Medium wurde angesetzt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Behandlung der Zellen erfolgte in 60 mm Kulturschalen:

1. Abgießen des Kulturmediums und Waschen der Zellen mit 5 ml Medium
2. Zugabe von 5 ml Medium mit der vorgesehenen Konzentration an MMC
3. Inkubation bei 37 °C für 60 min
4. Zweimaliges Waschen mit 5 ml Medium
5. Zugabe von 5 ml frischem Vollmedium

2.4 Die Versuchsblöcke

2.4.1 Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung

Nach 18 h Präinkubation mit 20 μ M BrdU wurde das Kulturmedium abgenommen und durch frisches, BrdU-freies Vollmedium ersetzt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in den Kulturschalen bestrahlt. Die Dosis-Effekt-Beziehung umfaßte den Bereich zwischen 0 und 7,2 Gy mit Einzeldosen im Abstand von 1,2 Gy. Auf die Bestrahlung folgte eine Erholungszeit von 20 h bis zur Fixierung.

2.4.2 Abhängigkeit der Entstehung von SCE nach Röntgenbestrahlung vom Zellzyklusstadium

Die Zellen wurden 14 h mit 20 μ M BrdU vorbehandelt. Danach wurde das BrdU-haltige Kulturmedium mit BrdU-freiem Vollmedium ersetzt. Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen in den Kulturschalen einmal zu einer der folgenden Zeitpunkte mit 4,8 Gy bestrahlt:

0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 13,5 h, 15 h, 16,5 h und 18 h.

Alle Zellen wurden 20 Stunden nach dem Mediumwechsel fixiert.

2.4.3 Versuche mit tetraploiden Zellen

Nach 14 h Präinkubation mit BrdU und Ersatz des Kulturmediums mit BrdU-freiem Vollmedium wurden die Zellen mit 2,4 oder 6 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde Colcemid in der Endkonzentration 0,08 μ g/ml zugesetzt. Während der folgenden Inkubationszeit von 6 h wurde die Zellteilung mitotischer Zellen, die in der G2-Phase bestrahlt wurden, blockiert, so daß diese Zellen tetraploid wurden.

Damit beim Auswaschen des Colcemids keine mitotischen Zellen verloren gingen, erfolgte dieser Schritt über einen der Zellpassage entsprechenden Vorgang unter Sammlung aller Überstände und der Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen. Nach Zentrifugation bei 120 g für 5 min, Absaugen des Überstands, Waschen des Pellets mit 5 ml Medium, Zentrifugation und Absaugen des Überstands wurden die Zellen wieder in 60 mm Petrischalen mit 5 ml Vollmedium ausgesät und 18 h inkubiert.

2.4.4 Experimente mit ER

Pro Versuchspunkt wurden fünf nahezu voll bewachsene 96 mm Petrischalen eingesetzt.

1. Abgießen des Mediums und vorsichtiges Spülen der Zellschicht zur Entfernung von toten und locker haftenden Interphasezellen aus der Kultur
2. Zugabe von 5 ml Vollmedium und Inkubation für 1 h
3. Ablösen der mitotischen Zellen mit Hilfe vorsichtigen Pipettierens und Sammeln der Zellsuspension der fünf Petrischalen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen
4. Zentrifugation bei 120 g für 5 min und Absaugen des Überstands
5. Aussäen der Zellen in einer 60 mm Petrischale mit 5 ml Vollmedium und Inkubation für 1 h
6. Bestrahlung der Zellen mit 3,6 Gy
7. Inkubation für 18 h
8. Induktion von ER mit einem nach WOLFF und AFZAL (1996) modifizierten Verfahren:
 - Behandlung der Zellen mit 0,08 µg/ml Colcemid für 1 h zur Anreicherung von Mitosen
 - Zweimaliges Waschen mit Medium
 - Erholungsphase für 30 min in 5 ml Vollmedium
 - Zugabe von Rotenon in der Endkonzentration 5 µg/ml zur Induktion von ER, Inkubation für 3 h
9. Sorgfältiges Auswaschen des Rotenons mit Trypsinieren der Zellen, Sammlung aller Überstände und der Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen, Zentrifugation und zwei Waschvorgängen mit jeweils 5 ml Medium
10. Aussäen der Zellen in einer 60 mm Petrischale mit 5 ml Vollmedium und Inkubation für 24 h

Es wurden zwei verschiedene Versuchssätze mit ER durchgeführt.

2.4.4.1 Bestrahlung unsubstituierter Zellen, Substitution mit BrdU in der nächsten S-Phase und Induktion von ER (7BT-ER)

Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde dem Kulturmedium BrdU in der Endkonzentration 20 µM zugesetzt, so daß in der folgenden S-Phase BrdU in die DNS eingebaut werden konnte. Das BrdU wurde 19 h später zusammen mit dem Colcemid vor

der Induktion der ER ausgewaschen. Die endoreduplizierten Zellen wurden ohne BrdU-Zusatz erholt. Dieser Versuchsaufbau ergab Diplochromosomen, die aus zwei differentiell gefärbten Chromosomen bestanden.

2.4.4.2 Bestrahlung BrdU-markierter Zellen, Substitution mit BrdU in der zweiten S-Phase und Induktion von ER (B7BT-ER)

Für diesen Versuch wurden die Zellen 18 h mit BrdU präinkubiert. Zur Substitution der Zellen mit BrdU wurden pro Versuchspunkt fünf 96 mm Petrischalen mit 10 ml Vollmedium, einschließlich 20 μ M BrdU, vorbereitet und mit jeweils 500 μ l Zellsuspension versetzt. Auch während der Bestrahlung und der Erholungszeit bis zur Induktion der ER war BrdU im Kulturmedium enthalten. Die endoreduplizierten Zellen wurden ohne BrdU inkubiert. Aufgrund dieser Versuchsanordnung bestanden die Diplochromosomen aus einem differentiell substituierten Chromosom und einem Chromosom, das in beiden Chromatiden unifilar BrdU enthielt.

2.4.5 Einfluß der Substitution von zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen

14 h vor der Bestrahlung wurden die Zellen für die Zugabe von 0,5 μ M BrdU subkultiviert oder zur Permeabilisierung für Biotin-dUTP elektroporiert. Nach Auswaschen des BrdU und dem Wechsel des Kulturmediums wurden die Zellen mit 4,8 Gy bestrahlt. Die Fixierung erfolgte nach einer Erholungszeit von 12 h.

2.4.6 Einfluß von BrdU oder Biotin-dUTP auf die Entstehung von SCE nach Behandlung mit MMC

Es wurde je eine Dosis-Effekt-Beziehung für MMC mit den BrdU-Konzentrationen 0,5 μ M und 20 μ M erstellt. Die Präinkubationszeit für beide BrdU-Konzentrationen betrug 14 h. Nach Erneuerung des Kulturmediums wurden die Zellen für 1 h mit 0,1 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M MMC behandelt. Danach wurden die Zellen gewaschen und in 60 mm Petrischalen mit 5 ml Vollmedium für 20 h erholt.

Zusätzlich wurde für 0,1 μ M MMC ein Parallelversuch mit Biotin-dUTP und 0,5 μ M BrdU unter Verwendung der oben beschriebenen Versuchszeiten durchgeführt.

2.5 Chromosomenpräparation

Jeweils 2 h vor Ende der Erholungszeit wurde den Kulturen Colcemid, ein Colchicin-Derivat, in der Endkonzentration 0,08 µg/ml zugegeben. Colchicin verhindert die Bildung des Spindelapparates, so daß die Chromosomen frei in der Zelle flottieren und auf dem Objektträger besser aufspreiten. Obwohl im folgenden nur der Begriff Metaphase verwendet wird, sind immer Colchicin-Metaphasen gemeint.

Die Aufarbeitung erfolgt unter nicht-sterilen Bedingungen.

1. Überführung eines Teils des Kulturmediums in ein Zentrifugenröhrchen, kräftiges Abspülen der lose haftenden mitotischen Zellen vom Boden der Gewebekulturschale mit einer Pasteurpipette und Überführung der Zellsuspension in das Zentrifugenröhrchen
2. Zentrifugation bei 120 g für 5 min und Absaugen des Überstands
3. Hypotone Behandlung mit 5 ml einer 1 % Natriumcitrat-Lösung für 10 min, Zentrifugation und Absaugen des Überstands
4. Fixierung der Zellen mit 5 ml eines Gemisches aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3 : 1 unter zunächst tropfenweiser, dann zügiger Zugabe der Lösung zur Verhinderung von Klumpenbildung, Zentrifugation und Verwerfen des Überstands
5. Zweimalige Wiederholung des Fixiervorgangs
6. Nach der dritten Fixierung Absaugen des Überstands bis auf 100 bis 1000 µl je nach Größe des Zellpellets
7. Resuspension mit einer Eppendorff-Pipette und Auftropfen auf fettfreie, gekühlte und feuchte Objektträger, Kontrolle der Spreitung und Dichte der Metaphasen im Phasenkontrastmikroskop
8. Lufttrocknung der Präparate für mindestens 12 h

2.6 Differentielle Schwesterchromatidenfärbung

Aufgrund der Inkorporation von BrdU oder Biotin-dUTP im vorletzten Zellzyklus vor der Fixierung sind die Schwesterchromatiden differentiell substituiert. Dies läßt sich mit verschiedenen Färbetechniken nachweisen.

Das übliche Verfahren zur Schwesterchromatidendifferenzierung nach Einbau von BrdU ist die FPG-Methode (PERRY und WOLFF 1974, HILL und WOLFF 1982). Diese Färbung wurde in allen Experimenten mit 20 μ M BrdU benutzt.

In den Experimenten mit 0,5 μ M BrdU und Biotin-dUTP wurde die Differenzierung mit Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. In den Versuchen mit MMC wurden einige Versuchspunkte mit hoher BrdU-Konzentration ebenfalls immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht, damit mögliche Unterschiede in der Genauigkeit der Auswertung erkannt werden konnten.

Alle Färbungen werden unter nicht-sterilen Bedingungen und, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.6.1 Fluoreszenz-plus-Giemsa-Färbung

1. Inkubation in einer wäßrigen Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33258 mit der Endkonzentration 4,5 μ g/ml für 20 min
2. Spülen in *Aqua dest.*
3. Benetzen der Objektträger mit PBS und Eindeckeln mit einem zweiten zellfreien, gereinigten Objektträger
4. Bestrahlen mit langwelligem ultraviolettem Licht (360 nm) auf einer Heizplatte bei 60 °C für 20 min
5. Entfernen der deckenden Objektträger in PBS
6. Färbung der Präparate in einer wäßrigen Giemsa-Lösung (5 % Giemsa-Farblösung, 20 % Phosphatpuffer, pH=6,8) für 10 min
7. Spülen in *Aqua dest.*
8. Lufttrocknung

2.6.2 Detektion von Biotin mit Tetramethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC)-konjugiertem Avidin

1. Vorbehandlung der Objektträger

Die Präparate werden 10 min in reinem Methanol dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Die Rehydrierung erfolgt für 3 min in PBS.

2. Präparation der Antikörper

Die Antikörper werden in einem Puffer gelöst, der aus 4xSSC/5% fettfreier Trockenmilch besteht (4M-Puffer). 4xSSC bezeichnet einen Verdünnungsgrad von 20xSSC, einer wäßrigen Lösung mit 3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat (*sodium saline citrate*). Der 4M-Puffer wird aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

TRITC-konjugiertes Avidin

Avidin ist kein Antikörper, sondern ein Protein aus dem Eiweiß von Vogeleiern, das eine hohe Affinität zu Biotin hat (GREEN 1975). Die Avidin-Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die aufgetaute Stammlösung wird in 4M-Puffer gelöst, so daß eine Verdünnung von 1 : 250 resultiert.

Biotinylierter Ziege-Anti-Avidin-Antikörper

Der Antikörper wird in 1 ml *Aqua dest.* gelöst, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die aufgetaute Anti-Avidin-Stammlösung wird in 4M-Puffer 1 : 160 verdünnt.

Bis zum Gebrauch werden die Antikörper bei -4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3. Detektion

Das Nachweisverfahren von Biotin mit TRITC-konjugiertem Avidin und biotinyliertem Anti-Avidin stellt eine Signalamplifizierung über drei Behandlungsschritte dar. Nach einer Inkubation mit Avidin wird der biotinylierte Ziege-Anti-Avidin-Antikörper angeboten, der entweder über die Antigen-Bindungsstelle oder mit Biotin an Avidin bindet. Nachfolgend kann Avidin an das Biotin der Anti-Avidin-Antikörper binden.

Die Objektträger werden in einer dunklen, feuchten Kammer liegend inkubiert. Alle Waschschritte erfolgen über Beschichtung der Objektträger mit 500 µl eines Puffers aus 4xSSC/0,05% Tween-20 in *Aqua dest.* (4T-Puffer) für 5 min bei Zimmertemperatur.

Vor der Behandlung mit Antikörpern werden die Präparate mit 100 µl 4M-Puffer unter Abdeckung mit 24 x 60 mm großen Parafilmstreifen für 5 min bei Zimmertemperatur präinkubiert, gefolgt von einem kurzen Waschschrift mit 4T-Puffer. Die Antikörper-Inkubation erfolgt jeweils für 30 min mit 100 µl Behandlungslösung unter Abdeckung mit Parafilm bei 37 °C.

Die Nachweisreaktion wird in Kurzform beschrieben:

1. Waschschrift mit 500 µl 4T-Puffer für 5 min bei Zimmertemperatur
2. Inkubation 1
 - Präinkubation mit 100 µl 4M-Puffer für 5 min unter Abdeckung mit Parafilm
 - Spülen mit 500 µl 4T-Puffer
 - Inkubation mit 100 µl Avidin-Lösung für 30 min bei 37 °C unter Abdeckung mit Parafilm
 - drei Waschschriffe mit je 500 µl 4T-Puffer für jeweils 5 min
3. Inkubation 2
 - Präinkubation mit 100 µl 4M-Puffer für 5 min unter Abdeckung mit Parafilm
 - Spülen mit 500 µl 4T-Puffer
 - Inkubation mit 100 µl Anti-Avidin-Lösung für 30 min bei 37 °C unter Abdeckung mit Parafilm
 - drei Waschschriffe mit je 500 µl 4T-Puffer für jeweils 5 min
4. Inkubation 3
 - Präinkubation mit 100 µl 4M-Puffer für 5 min unter Abdeckung mit Parafilm
 - Spülen mit 500 µl 4T-Puffer
 - Inkubation mit 100 µl Avidin-Lösung für 30 min bei 37 °C unter Abdeckung mit Parafilm
 - drei Waschschriffe mit je 500 µl 4T-Puffer für jeweils 5 min
5. Gegenfärbung mit 30 µl DAPI in DABCO *Antifade* und Abdeckung mit einem 24 x 60 mm Deckgläschen

Der Fluoreszenzfarbstoff 4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI; Endkonzentration 1,5 – 3 µg/ml) wird zur Verminderung des Ausbleichens in 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) *Antifade* gelöst: 0,233 g DABCO in 800 ml *Aqua dest.*, 200 ml 1M Tris-HCL (pH=8) und 9 ml Glycerol.

Die Präparate können für einige Wochen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung ist bei -20 °C möglich.

2.6.3 Detektion von BrdU mit Fluorescein-5-isothiocyanat(FITC)-konjugierten Antikörpern

1. Denaturierung

Die Präparate werden 30 min in 90 % Formamid/2xSSC, pH=7 bei 70 °C denaturiert. Anschließend werden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit eiskaltem 70 %, 90 % und 100 % Ethanol für je 3 min dehydriert. Nach Lufttrocknung der Präparate kann mit der Antikörperdetektion begonnen werden.

2. Präparation der Antikörper

Maus-Anti-BrdU-Antikörper

Der Antikörper wird aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Stammlösung wird aufgetaut und in PBS/0,1 % Rinderserumalbumin (*Bovine serum albumine*, BSA) gelöst, so daß eine Verdünnung von 1 : 100 resultiert.

FITC-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper

Der Antikörper wird nach Herstellerangaben in 1 ml *Aqua dest.* gelöst und bei 1600 g 15 min zentrifugiert. Aliquots dieser Stammlösung werden bei -20 °C eingefroren. Die Stammlösung wird aufgetaut und 1 : 200 in PBS verdünnt.

Die Antikörperlösungen werden bis zum Gebrauch bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3. Detektion

Die Objektträger werden in einer dunklen, feuchten Kammer liegend inkubiert. Die Antikörper-Inkubation erfolgt jeweils für 60 min mit 100 µl Behandlungslösung unter Abdeckung mit 24 x 60 mm großen Parafilmstreifen bei 37 °C. Alle Waschschritte erfolgen über Beschichtung der Objektträger mit 500 µl PBS für 5 min bei Zimmertemperatur.

Es folgt eine Kurzbeschreibung des Verfahrens:

1. Waschschrift mit 500 µl PBS für 5 min
2. Inkubation 1
 - Inkubation mit Maus-Anti-BrdU-Antikörpern für 60 min bei 37 °C unter Abdeckung mit Parafilm
 - drei Waschschriffe mit je 500 µl PBS für jeweils 5 min
3. Inkubation 2
 - Inkubation mit Ziege-Anti-Maus-Antikörpern für 60 min bei 37 °C unter Abdeckung mit Parafilm
 - drei Waschschriffe mit je 500 µl PBS für jeweils 5 min
4. Gegenfärbung mit 30 µl DAPI in DABCO *Antifade* und Abdeckung mit einem 24 x 60 mm Deckgläschen (wie oben beschrieben)

Die Präparate können einige Wochen bei 4 °C oder länger bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.7 Auswertung

Die lichtmikroskopische Analyse der FPG-gefärbten Metaphasen erfolgte bei tausendfacher Vergrößerung mit einem hundertfach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv und einem Okular mit zehnfacher Vergrößerung.

Es wurden nur gut gespreitete, vollständig differentiell gefärbte, erste Nachbehandlungsmitosen mit 20 bis 22 Chromosomen in diploiden Zellen, oder 40 bis 44 Chromosomen in tetraploiden Zellen ausgewertet. Ein SCE ist als Farbwechsel von hell nach dunkel oder umgekehrt auf einer Chromatide erkennbar. Es wurde die Gesamtanzahl der SCE in allen Chromosomen einer Metaphase notiert.

Zusätzlich wurden die Zellen nach den vorhandenen Typen von CA in folgende Gruppen eingeteilt: Metaphasen ohne erkennbare Aberrationen, mit CSA, mit CTA oder mit beiden Aberrationstypen (CSA+CTA). Außerdem wurde die Anzahl der RDM pro Metaphase ermittelt. Auf die genaue Auswertung von DIZ wurde in FPG-Präparaten verzichtet, weil sie nicht immer sicher zu identifizieren waren.

Besonderheiten in der Auswertung der einzelnen Versuchsblöcke werden im folgenden aufgeführt.

Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung

Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen pro Versuchspunkt 100 Metaphasen entsprechend der obigen Beschreibung ausgewertet wurden.

Abhängigkeit der Entstehung von SCE nach Röntgenbestrahlung vom Zellzyklusstadium

In drei unabhängigen Experimenten wurden pro Versuchspunkt 50 Metaphasen auf SCE und das Vorhandensein von CA analysiert. Die Ergebnisse zeigten, daß sich die Zellen zwischen 16,5 und 18 Stunden in der G2-Phase befanden. Nach der Replikation können beide Chromatiden eines Chromosoms unabhängig voneinander geschädigt werden. Bei Schädigung der beiden Chromatiden an etwa gleicher Position entstehen Isochromatidbrüche, die zu CSA führen können. Diese CSA sind aber nach ihrer Entstehungsweise CTA. Aus diesem Grund wurden für 16,5 und 18 Stunden alle gefundenen CSA den CTA zugeordnet.

Versuche mit tetraploiden Zellen

Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt. Je Versuchspunkt wurden 50 tetraploide und 50 diploide Metaphasen auf SCE untersucht.

7BT-ER

Es wurden nur endoreduplizierte Metaphasen ausgewertet, deren Diplochromosomen aus zwei differentiell gefärbten Chromosomen bestanden. Es konnten zwei Typen von SCE unterschieden werden, die nach TAYLOR (1958) als *Twin-SCE* und *Single-SCE* bezeichnet wurden:

Als *Twin-SCE* werden solche SCE gewertet, die in beiden Chromosomen an identischer Position vorliegen.

Single-SCE betreffen jeweils nur eines der beiden Chromosomen.

Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Anzahl der ausgewerteten Metaphasen pro Versuchspunkt war nicht in allen Experimenten gleich, Angaben hierzu sind in der Ergebnistabelle aufgeführt. In einer zusätzlichen Auswertung in denselben Präparaten wurden 50 diploide Zellen pro Versuchspunkt auf SCE untersucht.

B7BT-ER

Die Auswertung erfolgte nur in endoreduplizierten Metaphasen, die Diplochromosomen mit jeweils einem differentiell gefärbten Chromosom und einem hell gefärbten Chromosom aufwiesen. Die unterschiedlichen Typen von SCE wurden in Anlehnung an die Terminologie von WOLFF und AFZAL (1996) als BCE und SCE bezeichnet:

Ein BCE liegt vor, wenn der Farbwechsel von dunkel nach hell zwischen den beiden Chromosomen eines Diplochromosoms stattfindet. Ein einzelnes BCE innerhalb eines Diplochromosoms zeigt sich als ein dunkel gefärbtes Chromatidensegment im hellen Chromosom, während die dunkle Chromatide des differentiell gefärbten Chromosoms entsprechend dazu einen hellen Abschnitt trägt. BCE sind SCE aus dem ersten und zweiten Zellzyklus.

SCE sind Farbwechsel von dunkel nach hell innerhalb eines der beiden Chromosomen. Sie entstanden im dritten Zellzyklus.

In drei unabhängigen Experimenten wurden je 30 endoreduplizierte Metaphasen auf BCE und SCE untersucht.

Zum besseren Verständnis soll die Auswertung an einem Schema (Abb. 5) verdeutlicht werden, das insgesamt 6 BCE und 4 SCE zeigt:

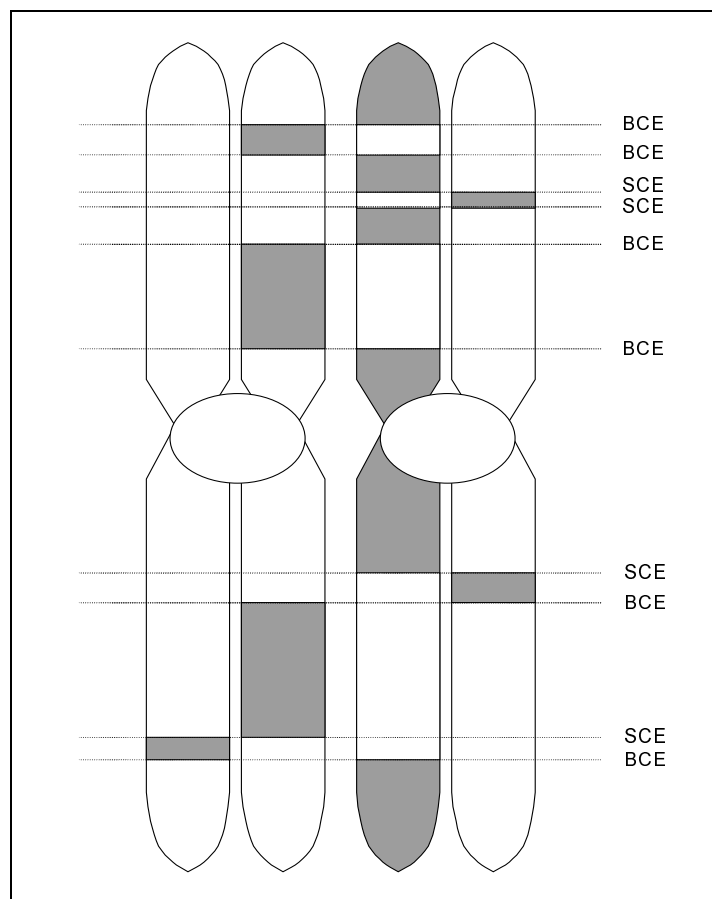


Abb. 5: Schema zur Auswertung von BCE und SCE.

Einfluß der Substitution zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen

Die Analyse der Metaphasen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop, das mit Filtern für FITC, TRITC und DAPI sowie mit einer CCD-Kamera für die Bildaufnahme ausgestattet war. Die Bilder wurden in das Bildverarbeitungsprogramm ISIS 3.0 eingelesen, das sowohl eine Einzeldarstellung der Farben als auch eine Gesamtansicht mit übereinandergelegten Farben ermöglicht.

Die Metaphasen wurden auf SCE und unter Verwendung des DAPI-Filters auf RDM und DIZ, beziehungsweise polyzentrische Chromosomen untersucht. Polyzentrische Chromosomen wurden in DIZ umgerechnet, indem von der Gesamtzahl der Zentromere eins subtrahiert wurde. Zusätzlich wurde analysiert, ob zwischen den Zentromeren der DIZ mindestens ein SCE vorlag. Es wurden zwei unabhängige Experimente ausgeführt, wobei pro Versuchspunkt nach Möglichkeit 50 Zellen ausgewertet wurden (genaue Angaben in der Ergebnistabelle).

Eine Besonderheit in der Auswertung betraf die Biotin-markierten Zellen, weil in ihnen einige Chromosomen regelmäßig nicht oder nicht vollständig markiert waren. Diesbezüglich auffällig waren die Chromosomen X und Z10, deren spätreplizierende Regionen nur selten Biotin-Signale aufwiesen, und die beiden kleinen Chromosomen Z12 und Z13. Diese vier Chromosomen wurden stets von der Auswertung ausgeschlossen, sie umfassen etwa 12 % des Genoms. Damit die Analysedaten der Biotin-dUTP-substituierten Zellen mit den Daten der BrdU-substituierten Zellen verglichen werden konnten, wurden die Frequenzen für SCE in Biotin-markierten Zellen durch 0,88 dividiert.

Einfluß von BrdU oder Biotin-dUTP auf die Entstehung von SCE nach Behandlung mit MMC

Die Dosis-Effekt-Beziehungen für MMC nach Substitution der Zellen mit 0,5 μM oder 20 μM BrdU wurden mit drei unabhängigen Experimenten erstellt, in denen pro Versuchspunkt 100 Metaphasen auf SCE ausgewertet wurden. Mit 20 μM BrdU substituierte Zellen wurden mit der FPG-Methode gefärbt und im Lichtmikroskop analysiert. Mit 0,5 μM BrdU markierte Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Der Parallelversuch mit Biotin-dUTP oder 0,5 μM BrdU und einer Behandlung mit 0,1 μM MMC wurde zweimal durchgeführt, jeweils 50 Zellen wurden auf SCE untersucht.

Zur Ermittlung der Genauigkeit der Auswertungsmethoden wurden Kontrollen und mit 1 μM MMC behandelte Zellen nach Substitution mit 20 μM BrdU fluoreszenzmikroskopisch auf SCE untersucht.

2.8 Bezugsquellennachweis

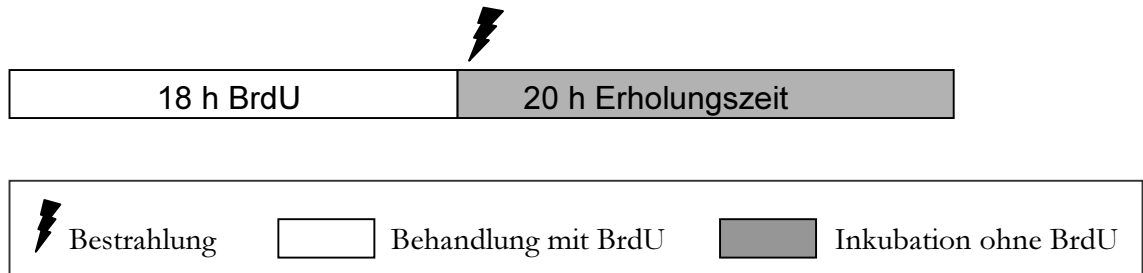
20xSSC	Gibco/BRL, Eggenstein
Avidin, TRITC-konjugiert, Vector A-2002	Vector Inc., über Alexis GmbH, Deutschland
Bildbearbeitungssoftware	Corel, Kanada
Bildverarbeitungssoftware ISIS 3.0, CCD-Kamera und Hardware	MetaSystems, Altlussheim
Biotin-dUTP	Boehringer, Mannheim
BrdU	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
CHO-9-Zellen	Prof. A.T. Natarajan, Leiden, Niederlande
Colcemid	Ciba, Basel
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
DABCO	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Serva, Heidelberg
Dihydrostreptomycinsulfat	Seromed, Berlin
DMSO	J.T. Baker, Niederlande
dTTP	Boehringer, Mannheim
FKS	Gibco/BRL, Eggenstein
Formamid	Merck, Darmstadt
GenePulser, Elektroporationsapparat und Küvetten	Bio-Rad, München
Giemsa-Farblösung	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Hoechst 33258	Boehringer, Mannheim
Maus-Anti-BrdU-Antikörper, M1550	CLB, Niederlande
McCoy's 5A-Medium	Gibco/BRL, Eggenstein
Melsept	Braun, Melsungen
Mikroskope und Immersionsöl	Olympus, Hamburg
MMC	medac, Hamburg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Parafilm	American Can Company, USA
PBS	Seromed, Berlin
Penicillin	Seromed, Berlin
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg

Röntgenbestrahlungseinheit	Philips, Hamburg
Rotenon	Sigma, Deisenhofen
Sterile Kunststoffartikel	Greiner, Nürtingen
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Trockenmilch, fettfrei	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Fluka, Neu-Ulm
Trypsin-EDTA-Lösung	Seromed, Berlin
Tween-20	Merck, Darmstadt
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Ziege-Anti-Avidin-Antikörper, Biotin-konjugiert, Vector BA-0300	Vector Inc., über Alexis GmbH, Deutschland
Ziege-Anti-Maus-Antikörper, FITC-konjugiert, M1204	CLB, Niederlande

3 ERGEBNISSE

3.1 Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung

CHO-Zellen wurden nach folgendem Versuchsschema behandelt:



Die Dosis-Effekt-Beziehung umfaßte den Bereich zwischen 0 und 7,2 Gy. In FPG-gefärbten, differentiell markierten, ersten Nachbehandlungsmitosen wurde die Anzahl der SCE pro Zelle bestimmt und überprüft, ob und welche Typen von CA vorlagen. Zusätzlich wurde die Anzahl der RDM vermerkt. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind in Tab. 1 und 2 sowie in Abb. 6 und 7 zusammengestellt und können wie folgt beschrieben werden:

Sowohl die Frequenzen von SCE als auch von RDM steigen mit der Dosis an. SCE zeigen ab 6 Gy eine Sättigung. Die Häufigkeiten für SCE und RDM im Dosisbereich von 0 bis 4,8 Gy folgen einer linear-quadratischen Funktion, wobei der quadratische Term sehr niedrig ist. Die SCE-Frequenzen unterscheiden sich im gesamten Dosisbereich signifikant von den Kontrollen (Student t-Test; $p < 0,01$).

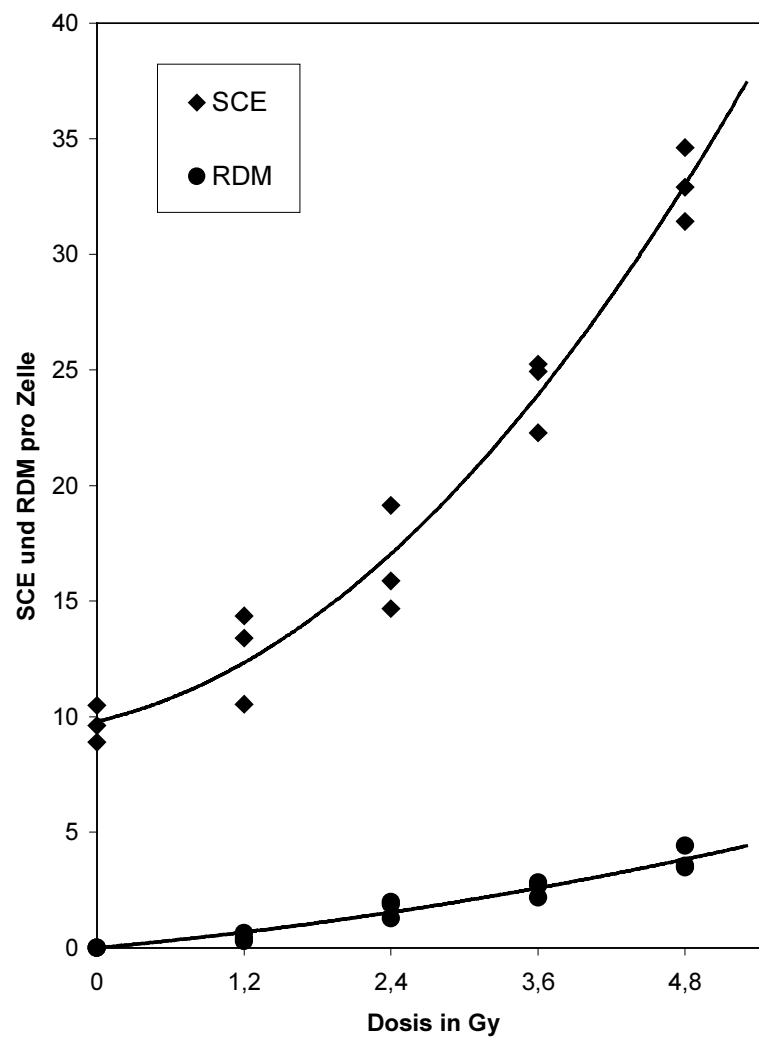
Der Anteil von Zellen mit CA steigt mit der Dosis an und erreicht bei 3,6 Gy 100 %. Die Zellen enthalten entweder CSA oder CSA+CTA. Zellen, die nur CTA enthalten, werden nicht gefunden.

Ein Vergleich der SCE-Frequenzen in Zellen ohne CA, mit CSA oder CSA+CTA ergibt für alle Dosen, ausgenommen 6 Gy, keine signifikanten Unterschiede (t-Test; $p > 0,05$). Nach Bestrahlung mit 6 Gy weisen Zellen mit CSA und Zellen mit CSA+CTA signifikant unterschiedliche SCE-Frequenzen auf (t-Test, $p < 0,01$).

Tab. 1: Frequenzen für SCE und RDM nach Röntgenbestrahlung BrdU-substituierter CHO-Zellen. Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Versuchspunkt wurden 100 Zellen ausgewertet.

Dosis in Gy	SCE			RDM		
0	9,66	±	0,46	0		
1,2	12,76	±	1,15	0,45	±	0,10
2,4	16,56	±	1,33	1,71	±	0,22
3,6	24,14	±	0,94	2,57	±	0,20
4,8	32,98	±	0,92	3,81	±	0,30
6,0	39,88	±	0,77	4,94	±	0,17
7,2	37,69	±	1,61	5,49	±	0,17

Abb. 6: Dosis-Effekt-Beziehung für SCE und RDM nach Röntgenbestrahlung BrdU-markierter CHO-Zellen mit Dosen zwischen 0 und 4,8 Gy. Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und linear-quadratische Regression für SCE ($y = 0,7562x^2 + 1,204x + 9,7986$, $r = 0,99$) und für RDM ($y = 0,0659x^2 + 0,4821x$, $r = 0,98$).

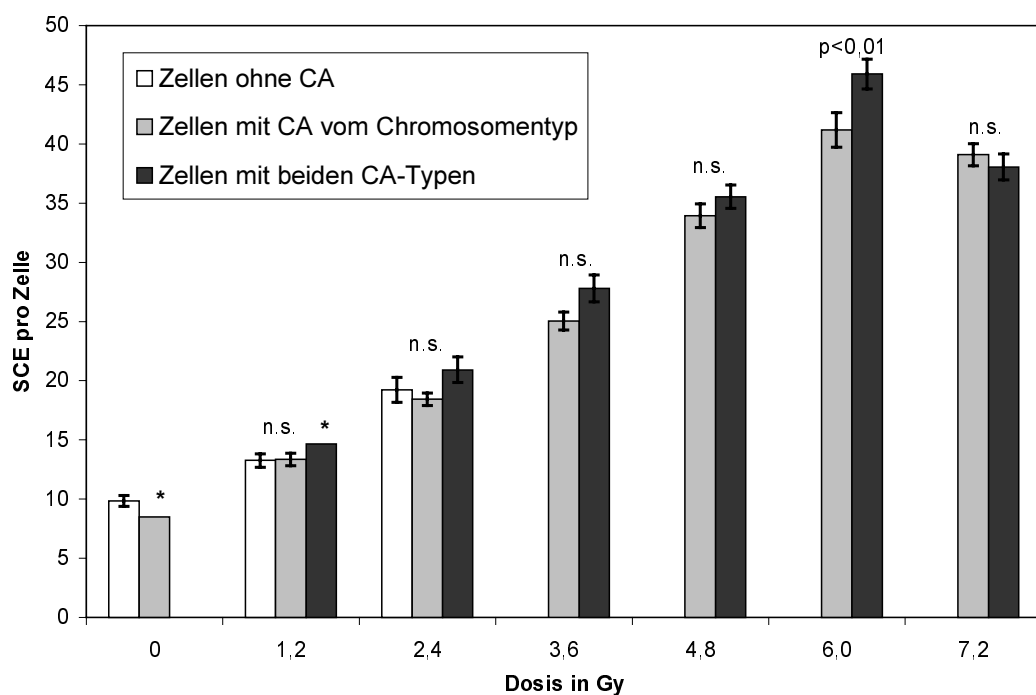


Tab.2: Prozentualer Anteil der Zellen ohne CA, mit CSA oder mit CSA+CTA nach Röntgenbestrahlung BrdU-markierter CHO-Zellen und in Klammern die SCE-Frequenzen mit Standardfehler der Einzelwerte (SE).

Dosis in Gy	Zellen ohne CA	Zellen mit CA vom Chromosomentyp	Zellen mit beiden Typen von CA
0	98,67 (9,84 ± 0,45)	1,33 (8,5)*	0
1,2	33,33 (13,26 ± 0,57)	64,67 (13,35 ± 0,54)	2,00 (14,67)*
2,4	8,67 (19,23 ± 1,05)	81,33 (18,43 ± 0,51)	10,00 (20,93 ± 1,08)
3,6	0	72,00 (25,04 ± 0,76)	28,00 (27,79 ± 1,12)
4,8	0	58,67 (33,93 ± 0,99)	41,33 (35,55 ± 0,98)
6,0	0	52,67 (41,20 ± 1,45)	47,33 (45,90 ± 1,25)
7,2	0	65,33 (39,09 ± 0,95)	34,67 (38,06 ± 1,11)

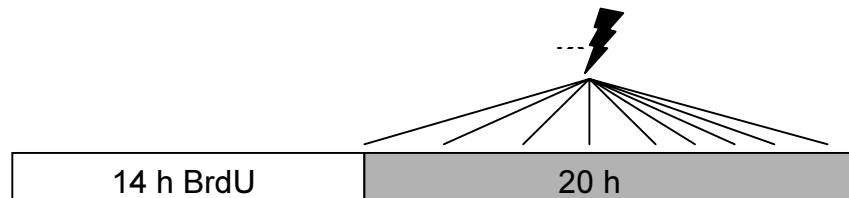
* Aufgrund der geringen Datenmenge wird kein SE angegeben

Abb. 7: SCE-Frequenzen in Zellen ohne CA, mit CSA oder CSA+CTA nach Röntgenbestrahlung BrdU-substituierter CHO-Zellen. Angegeben ist jeweils die mittlere SCE-Frequenz pro Zelle, der SE und die Signifikanz der Abweichungen. n.s. = nicht signifikant mit $p > 0,05$, * = keine statistische Untersuchung möglich aufgrund zu geringer Zellanzahl.



3.2 Abhängigkeit der Entstehung von SCE nach Röntgenbestrahlung vom Zellzyklusstadium

CHO-Zellen wurden nach folgendem Versuchsschema behandelt:



Die Zellen wurden 0, 3, 6, 9, 12, 13,5, 15, 16,5 oder 18 Stunden nach Ende der Präinkubation mit BrdU einmal mit 4,8 Gy bestrahlt. Differentiell gefärbte, erste Nachbehandlungsmetaphasen wurden nach SCE und nach CA-Typen analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 und 4 sowie in Abb. 8 und 9 dargestellt und können wie folgt zusammengefaßt werden:

Bei Bestrahlung zwischen 0 und 9 Stunden verändert sich die SCE-Frequenz von im Mittel $27,55 \pm 0,32$ nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$). Zwischen 9 und 18 Stunden sinkt die Häufigkeit der SCE auf Kontrollniveau. Von 9 bis 16,5 Stunden ist die Abnahme der SCE-Frequenzen zwischen den einzelnen Behandlungspunkten signifikant (t-Test, $p < 0,01$). Für 16,5 und 18 Stunden gleicht die Anzahl der SCE der Kontrollfrequenz (t-Test, $p > 0,05$).

In der Kontrolle werden nur ungeschädigte Zellen gefunden, alle bestrahlten Zellen zeigen CA. Der prozentuale Anteil der Zellen mit CSA sinkt zwischen 0 und 15 Stunden von 80 auf etwa 9 %. Dagegen nimmt der Anteil der Zellen mit CSA+CTA von 20 auf ungefähr 79 % zu. Von 12 bis 15 Stunden enthält ein geringer Anteil von Zellen ausschließlich CTA. Zwischen 16,5 und 18 Stunden befanden sich die Zellen in der G2-Phase. Daher werden für diese Zeiten alle CA den CTA zugerechnet, weil sie auf Chromatiden- oder Isochromatidbrüche zurückzuführen sind.

Die SCE-Frequenzen in Zellen mit CSA, CSA+CTA oder CTA unterscheiden sich mit Ausnahme der Versuchspunkte 3 und 15 Stunden nicht signifikant voneinander (t-Test, $p > 0,05$). Bei 3 und 15 Stunden weichen die SCE-Frequenzen in Zellen mit CSA und Zellen mit CSA+CTA signifikant voneinander ab (t-Test, $p < 0,05$).

Tab. 3: SCE-Frequenzen in CHO-Zellen in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt nach Ende der Präinkubation mit BrdU. Die Bestrahlung erfolgte mit 4,8 Gy. Alle Zellen wurden nach 20 h fixiert. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Versuchen. Pro Versuchspunkt wurden 50 Zellen ausgewertet.

Kontrolle	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	13,5 h	15 h	16,5 h	18 h
9,07 ± 0,20	27,23 ± 0,83	27,03 ± 0,95	27,47 ± 1,04	28,46 ± 1,75	19,82 ± 1,12	18,92 ± 1,14	16,39 ± 0,58	9,22 ± 0,61	8,63 ± 0,22

Tab. 4: Prozentualer Anteil der Zellen ohne CA, mit CSA, mit CSA+CTA oder CTA in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt nach Ende der Präinkubation mit BrdU. Die Strahlendosis lag bei 4,8 Gy. Fixierung erfolgte bei 20 h. SCE-Frequenzen mit SE in Klammern. n.v. = nicht vorhanden.

	Zellen ohne CA	Zellen mit CA vom Chromosomentyp	Zellen mit beiden Typen von CA	Zellen mit CA vom Chromatidentyp
Kontrolle	100 (9,07 ± 0,20)	n.v.	n.v.	n.v.
0 h	n.v.	80,00 (25,75 ± 0,94)	20,00 (29,73 ± 1,41)	n.v.
3 h	n.v.	68,00 (25,55 ± 1,06)	32,00 (29,54 ± 1,72)	n.v.
6 h	n.v.	64,00 (27,02 ± 1,22)	36,00 (30,11 ± 1,41)	n.v.
9 h	n.v.	36,00 (30,37 ± 1,48)	64,00 (27,00 ± 1,18)	n.v.
12 h	n.v.	21,33 (23,45 ± 1,54)	73,33 (19,08 ± 0,85)	5,33 (15)*
13,5 h	n.v.	21,33 (21,75 ± 1,91)	62,67 (18,47 ± 0,92)	16,00 (15,75 ± 1,58)
15 h	n.v.	9,33 (17,86 ± 1,94)	78,67 (15,69 ± 0,71)	12,00 (16,78 ± 1,57)
16,5 h	n.v.	n.v.	n.v.	100 (9,22 ± 0,61)
18 h	n.v.	n.v.	n.v.	100 (8,63 ± 0,22)

* Aufgrund zu geringer Datenmenge erfolgt keine Bestimmung des SE und keine statistische Analyse

Abb. 8: SCE-Frequenz in CHO-Zellen in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt nach Ende der Präinkubation mit BrdU. Die Zellen wurden mit 4,8 Gy bestrahlt. Alle Zellen wurden nach 20 h fixiert (F). Ergebnisse der drei Einzelerperimente sowie der Mittelwert.

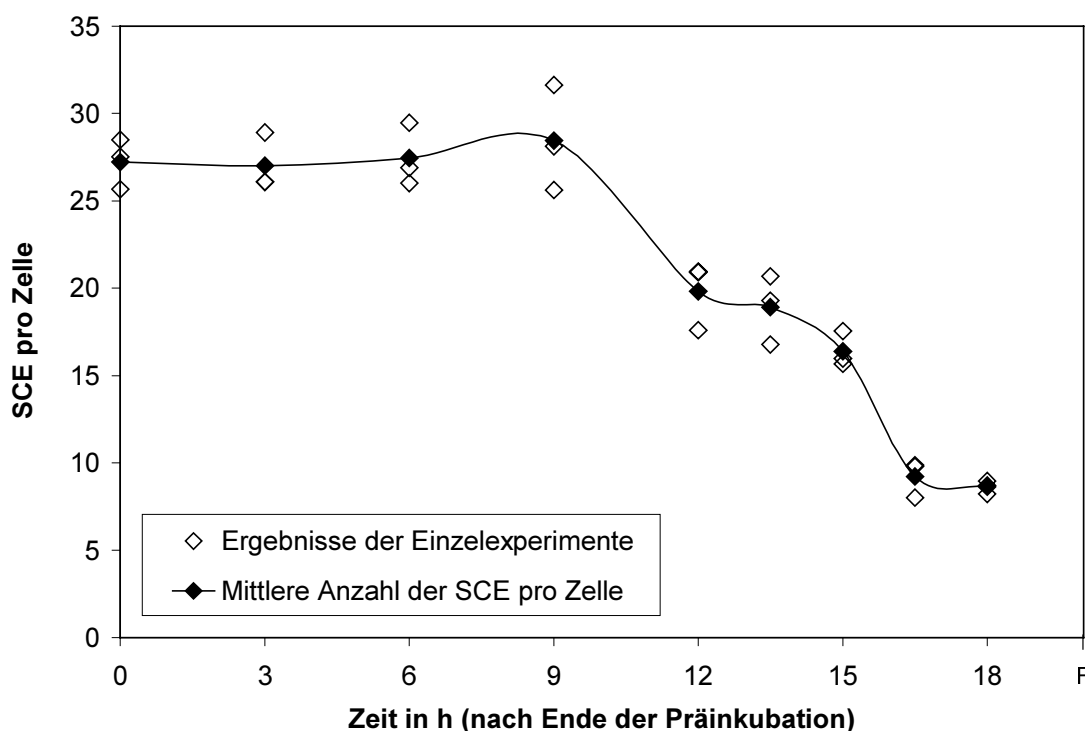
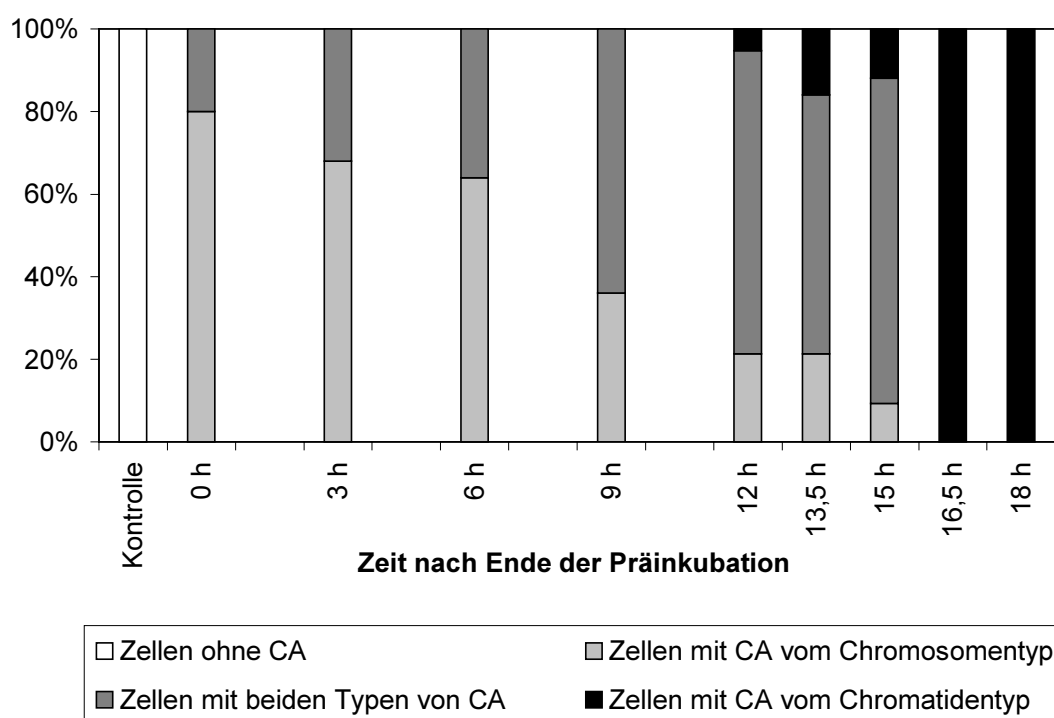
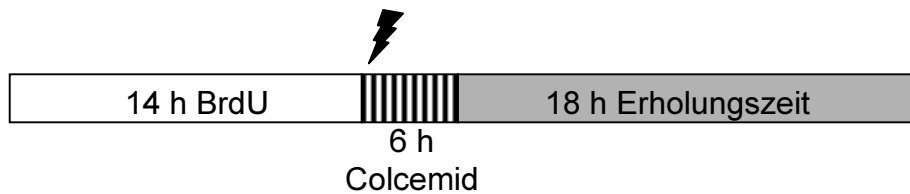


Abb. 9: Prozentualer Anteil der Zellen ohne CA, mit CSA, mit CSA+CTA oder CTA in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitpunkt nach Ende der Präinkubation mit BrdU. Die Bestrahlung erfolgte mit 4,8 Gy. Alle Zellen wurden nach 20 h fixiert.



3.3 Versuche mit tetraploiden Zellen

CHO-Zellen wurden nach folgendem Versuchsschema behandelt:



Die Zellen wurden mit 2,4 oder 6 Gy bestrahlt. Mit der Colcemid-Behandlung wurde die Zellteilung der in der G2-Phase bestrahlten Zellen unterdrückt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden pro Versuchspunkt je 50 tetraploide und diploide Metaphasen mit vollständiger Differenzierung auf SCE untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 und Abb. 10 dargestellt und können wie folgt beschrieben werden:

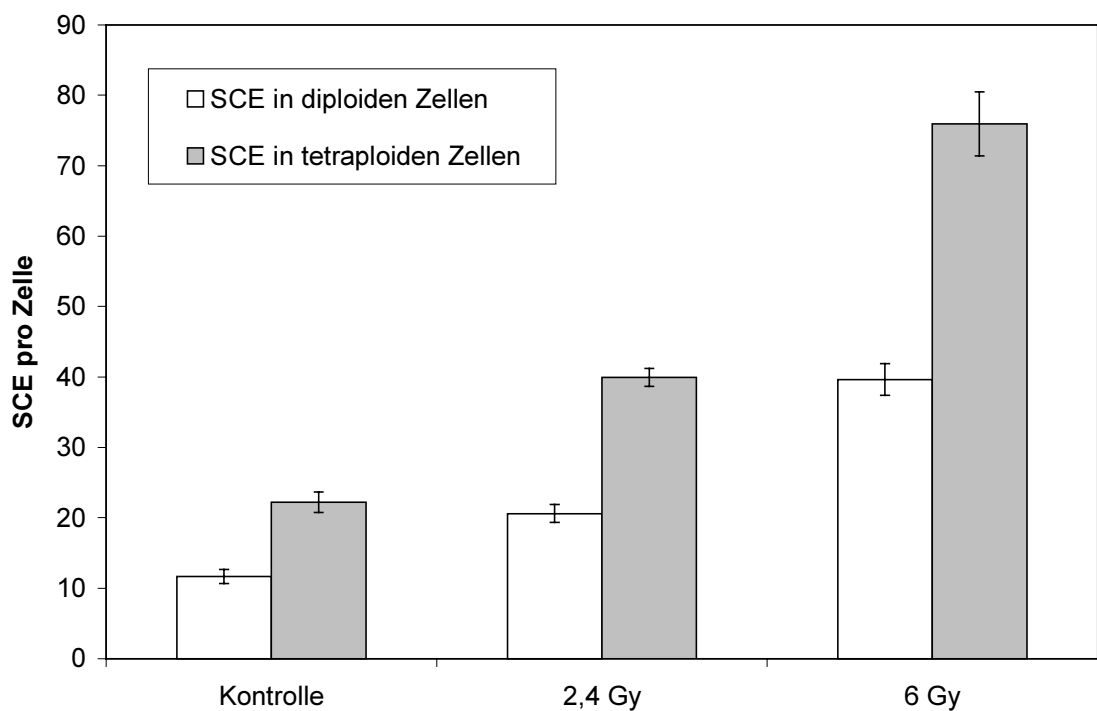
Die Frequenzen von SCE sind sowohl in diploiden als auch in tetraploiden Zellen in allen Behandlungspunkten signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (t-Test, $p < 0,01$).

Die Anzahl der SCE in tetraploiden Zellen ist im Vergleich zu diploiden Zellen verdoppelt. Für eine statistische Analyse werden die Frequenzen der SCE in diploiden Zellen mit zwei multipliziert, damit sie mit den SCE in tetraploiden Zellen verglichen werden können. Für 2,4 und 6 Gy können mit dieser Berechnung keine signifikanten Unterschiede zwischen den SCE-Frequenzen diploider und tetraploider Zellen festgestellt werden (t-Test, $p > 0,05$). Die SCE in Kontrollen in diploiden und tetraploiden Zellen weichen jedoch signifikant voneinander ab (t-Test, $p < 0,01$).

Tab. 5: SCE in diploiden und tetraploiden Zellen nach Bestrahlung BrdU-markierter CHO-Zellen und anschließender Colcemid-Behandlung. Pro Versuchspunkt wurden je 50 diploide und tetraploide Zellen ausgewertet. Mittelwerte aus drei Versuchen mit den SEM.

	SCE in diploiden Zellen	SCE in tetraploiden Zellen
Kontrolle	11,66 ± 0,98	22,21 ± 1,43
2,4 Gy	20,61 ± 1,27	39,95 ± 1,26
6 Gy	39,64 ± 2,25	75,94 ± 4,55

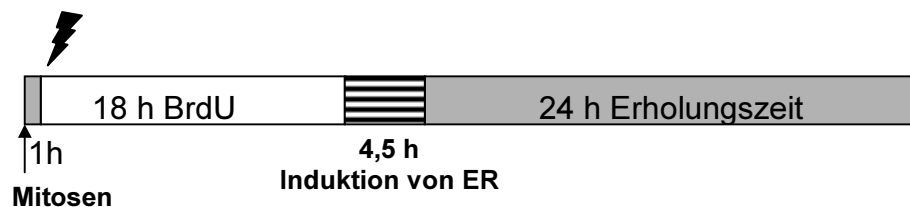
Abb. 10: SCE in diploiden und tetraploiden Zellen nach Bestrahlung BrdU-substituierter CHO-Zellen und anschließender Colcemid-Behandlung. Dargestellt sind die mittleren Frequenzen für SCE und die SEM.



3.4 Experimente mit ER

3.4.1 7 BT-ER

CHO-Zellen wurden nach folgendem Versuchsschema behandelt:



Die Zellen wurden mit 3,6 Gy in der G1-Phase bestrahlt.

Dieser Versuchsplan ergibt Diplochromosomen, die aus zwei differentiell gefärbten Chromosomen bestehen (Abb. 3 und Abb. 18). Es wurden *Twin*-SCE und *Single*-SCE ausgewertet. Tab. 6 und Abb. 11 zeigen die Frequenzen für *Twin*-SCE und *Single*-SCE aus drei unabhängigen Versuchen. In einer zusätzlichen Auswertung in den gleichen Präparaten wurden 50 diploide Zellen pro Versuchspunkt auf SCE untersucht (Tab. 7). Im folgenden sollen die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt werden:

Die Frequenzen der *Twin*- und *Single*-SCE weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlung auf (t-Test, $p > 0,05$).

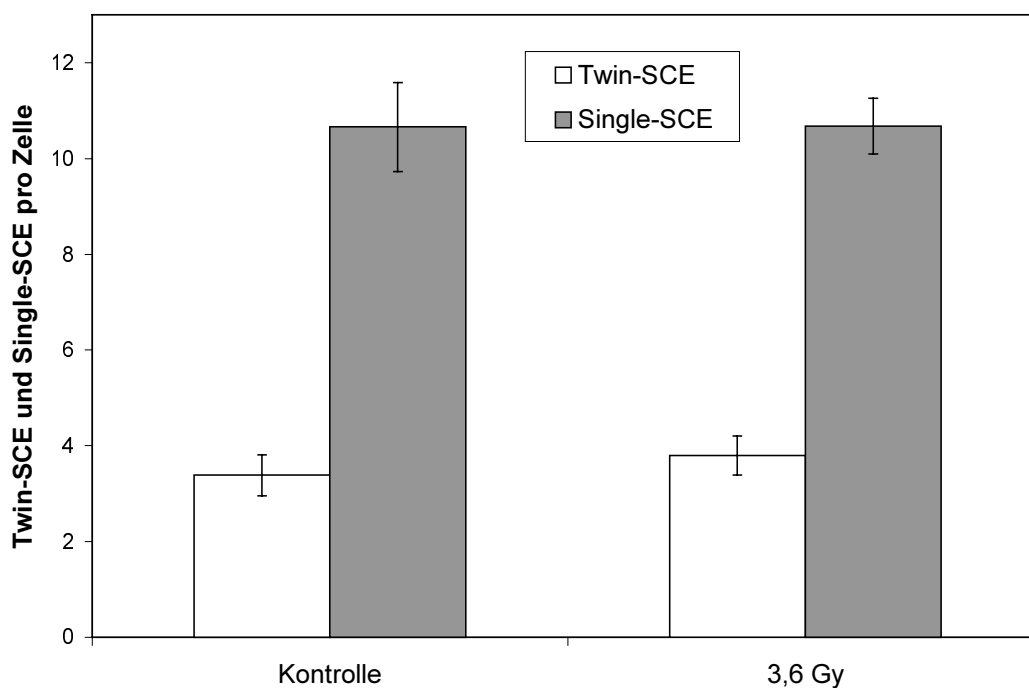
Zum Vergleich der Frequenzen der im ersten und im zweiten Zellzyklus entstandenen SCE muß die Anzahl der *Single*-SCE aufgrund der doppelten Chromosomenzahl im zweiten Zellzyklus durch zwei dividiert werden. Es ist auffällig, daß deutlich mehr SCE im zweiten Zellzyklus (etwa 5,3 SCE) entstanden sind als im ersten Zellzyklus (im Mittel 3,6 SCE). Dieser Unterschied ist hoch signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

Die SCE-Frequenz in diploiden Zellen der Kontrolle entspricht den Kontrollwerten der Dosis-Effekt-Beziehung für Röntgenstrahlen (t-Test, $p > 0,05$). Die Häufigkeit der SCE in bestrahlten diploiden Zellen ist jedoch signifikant erhöht (t-Test, $p < 0,01$).

Tab. 6: *Twin*- und *Single*-SCE in 7BT-ER. Ergebnisse der Einzelexperimente mit der Anzahl der ausgewerteten Zellen und Mittelwerte mit den SEM.

	Kontrolle			3,6 Gy		
	Anzahl der Zellen	<i>Twin</i> -SCE	<i>Single</i> -SCE	Anzahl der Zellen	<i>Twin</i> -SCE	<i>Single</i> -SCE
Versuch 1	65	3,68	12,20	87	3,84	11,25
Versuch 2	24	2,54	9,00	73	3,07	9,52
Versuch 3	50	3,94	10,78	50	4,5	11,28
Mittelwert		3,39 ± 0,43	10,66 ± 0,93		3,80 ± 0,41	10,68 ± 0,58

Abb. 11: *Twin*- und *Single*-SCE in 7BT-ER. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen sowie die SEM.



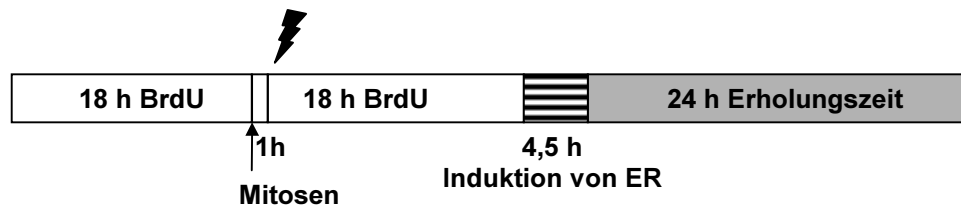
Tab. 7: SCE in diploiden Metaphasen, ausgewertet in den gleichen Präparaten wie 7BT-ER. Mittelwerte aus drei Versuchen und SEM. Pro Versuch wurden 50 Zellen ausgewertet. Zum Vergleich wird der Kontrollwert der Dosis-Effekt-Beziehung für Röntgenstrahlen angegeben.

	SCE in diploiden Zellen
Kontrolle	10,58 ± 0,34
3 Gy	12,97 ± 0,39
Kontrolle *	9,66 ± 0,46

* Mittelwert der Kontrolle aus der Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Röntgenbestrahlung

3.4.2 B7BT-ER

CHO-Zellen wurden nach folgendem Versuchsschema behandelt:

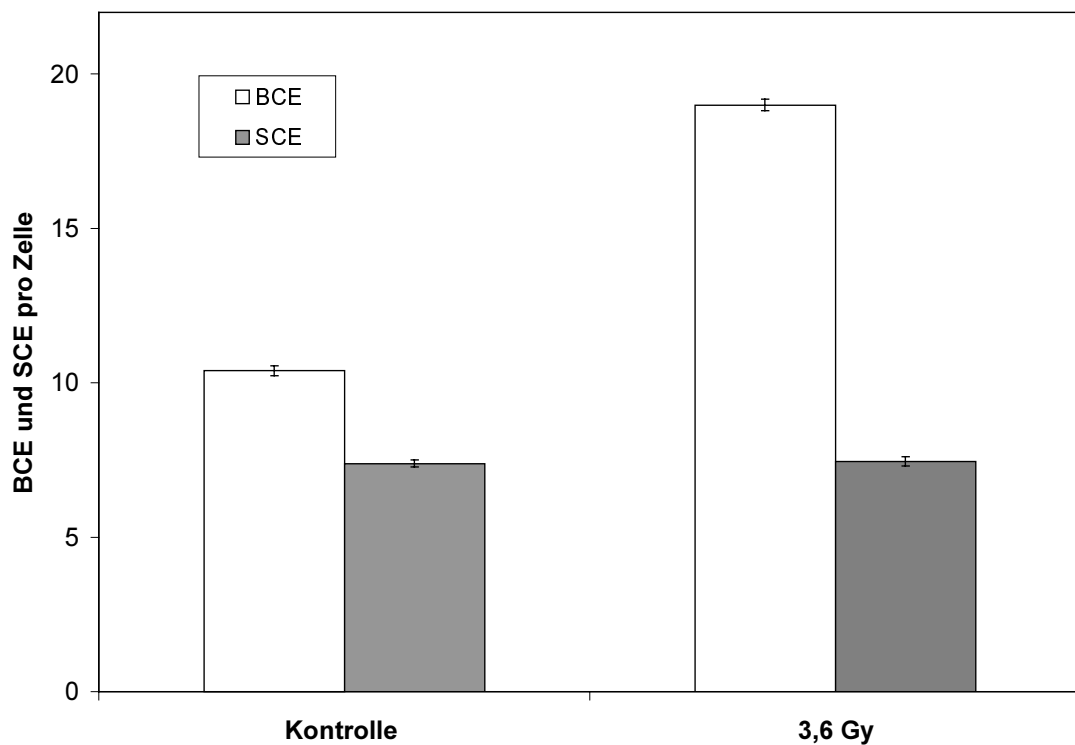


Im Unterschied zu 7BT-ER wurden hier BrdU-substituierte Zellen mit 3,6 Gy bestrahlt. Aufgrund dieser Versuchsanordnung bestanden die Diplochromosomen aus einem differentiell substituierten Chromosom mit je einer hellen und einer dunklen Chromatide und einem Chromosom, das in beiden Chromatiden unifilar BrdU enthielt und entsprechend hell gefärbt war (Abb. 4 und Abb. 19). Endoreduplizierte Metaphasen mit dieser Färbung wurden auf BCE und SCE untersucht. Tab. 8 und Abb. 12 zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. Sie können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Anzahl der BCE nach Röntgenbestrahlung mit 3,6 Gy ist gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (t-Test, $p < 0,01$). Die Frequenzen der SCE in Kontrolle und Behandlung weichen jedoch nicht signifikant voneinander ab (t-Test, $p > 0,05$).

Tab. 8: BCE und SCE in B7BT-ER. Pro Versuchspunkt wurden 30 Zellen ausgewertet. Ergebnisse der Einzelerperimente und Mittelwerte mit den SEM.

	Kontrolle		3,6 Gy	
	BCE	SCE	BCE	SCE
Versuch 1	10,33	7,57	18,90	7,20
Versuch 2	10,70	7,57	18,87	7,73
Versuch 3	10,17	7,03	19,23	7,43
Mittelwert	$10,40 \pm 0,16$	$7,39 \pm 0,18$	$19,00 \pm 0,12$	$7,46 \pm 0,15$

Abb. 12: BCE und SCE in B7BT-ER. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM.

3.5 Einfluß der Substitution von zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen

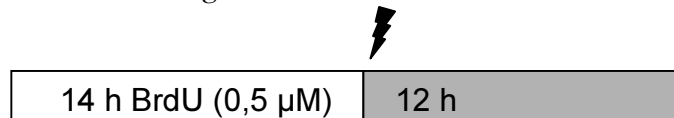
Mit der Substitution von zellulärer DNS mit Biotin-dUTP und dem Nachweis der Inkorporation des biotinylierten Nukleotids mit TRITC-konjugiertem Avidin wird eine neue Methode zur Darstellung von SCE vorgestellt, deren Besonderheiten kurz beschrieben werden sollen.

Etwa 5 bis 10 % der Metaphasen waren differentiell mit Biotin-dUTP markiert und konnten nach SCE analysiert werden. Die Fluoreszenzfärbung erscheint häufig körnig und nicht gleichmäßig, sie erlaubt dennoch den Nachweis eng benachbarter SCE (Abb. 20 a und c).

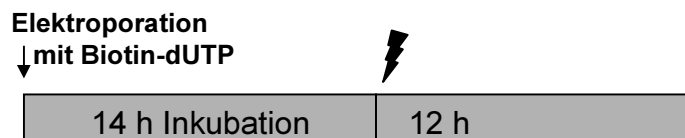
In differenziert Biotin-dUTP-substituierten Metaphasen sind regelmäßig einige Chromosomen nicht oder nicht vollständig markiert (Abb. 20a und c). Der lange, heterochromatische Arm des X-Chromosoms (in seltenen Fällen auch das gesamte X-Chromosom, wie in Abb. 20 c) und ein zentromernaher Teil des Chromosoms Z10 weisen regelmäßig keine

Biotinylierung auf. Auch in den kleinen Chromosomen Z12 und Z13 ist die Markierung nicht immer deutlich. Diese vier Chromosomen werden daher von der Auswertung ausgeschlossen, sie umfassen etwa 12 % des Genoms. Damit die Analysedaten der Biotin-dUTP-substituierten Zellen mit den Daten der BrdU-substituierten Zellen verglichen werden können, werden die Frequenzen für SCE in Biotin-markierten Zellen durch 0,88 dividiert.

CHO-Zellen wurden nach folgenden Versuchsschemata behandelt:



oder



Die Zellen wurden mit 4,8 Gy bestrahlt. Die Auswertung erfolgte mit Immunfluoreszenzmikroskopie. Differenziert markierte Metaphasen wurden auf SCE, RDM und DIZ untersucht. Zusätzlich wurde in Versuch 2 analysiert, ob zwischen den beiden Zentromeren von DIZ SCE vorlagen. Neben Biotin-markierten Zellen wurden in den gleichen Präparaten auch unmarkierte Zellen nach RDM und DIZ ausgewertet. Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen sind in Tab. 9 und 10 sowie in Abb. 13 dargestellt und können wie folgt beschrieben werden:

Die SCE-Frequenzen in den Kontrollen in Biotin-dUTP- und BrdU-markierten Zellen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$).

Sowohl in biotinylierten als auch in BrdU-substituierten Zellen ist die Anzahl der SCE pro Zelle nach Röntgenbestrahlung mit 4,8 Gy gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (t-Test, $p < 0,01$). Nach unifilarer Markierung erhöhte 4,8 Gy Röntgenbestrahlung die SCE-Frequenz in BrdU-markierten Zellen annähernd dreifach, in Biotin-dUTP-substituierten Zellen lediglich 1,8fach. Der Unterschied ist hoch signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

Die Frequenz der SCE ist nach Markierung mit 0,5 µM BrdU sowohl in der Kontrolle als auch nach Röntgenbestrahlung mit 4,8 Gy signifikant niedriger als nach Substitution mit

20 μM BrdU (Vergleich mit den entsprechenden Werten der Dosis-Effekt-Beziehung, t-Test, $p < 0,01$).

Die Anzahl der DIZ und RDM ist nach Bestrahlung in BrdU-substituierten Zellen leicht erhöht gegenüber den Zellen mit Biotin-dUTP-Markierung. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (χ^2 -Test für Proben mit Poisson-Verteilung auf einem Signifikanzniveau von 5 %). In Kontrollkulturen werden weder nach BrdU-Markierung noch nach Biotin-dUTP-Substitution CA gefunden.

In Biotin-dUTP-markierten Zellen enthalten 46 % der DIZ mindestens ein SCE zwischen den Zentromeren, in BrdU-substituierten Zellen 52 % (ermittelt in Versuch 2).

Zur Überprüfung, ob Biotin-dUTP die Häufigkeit von CA beeinflusst, werden pro Versuchspunkt 50 Zellen ohne Biotin-Markierung auf DIZ und RDM untersucht. In Zellen der Kontrollen werden keine CA gefunden. Für bestrahlte Zellen ist der Unterschied zwischen unmarkierten und biotinylierten Zellen nicht signifikant (χ^2 -Test für Proben mit Poisson-Verteilung auf einem Signifikanzniveau von 5 %).

Tab. 9: SCE sowie DIZ und RDM pro Zelle nach Bestrahlung Biotin-dUTP- oder BrdU-markierter CHO-Zellen, analysiert mit Immunfluoreszenzmikroskopie. In Biotin-dUTP-markierten Zellen werden die SCE-Daten mit der Division durch 0,88 korrigiert. Ergebnisse der Einzelexperimente, Mittelwerte und SE für SCE.

Biotin-dUTP								
	Kontrolle			4,8 Gy				
	Anzahl der Zellen	SCE	SCE korrigiert	Anzahl der Zellen	SCE	SCE korrigiert	DIZ	RDM
Versuch 1	50	5,31	6,06	48	9,69	11,04	1,08	1,71
Versuch 2	50	6,24	7,11	50	10,82	12,33	0,78	1,28
Mittelwert		5,78 \pm 0,25	6,58		10,25 \pm 0,31	11,69	0,93	1,49
BrdU								
	Kontrolle			4,8 Gy				
	Anzahl der Zellen	SCE		Anzahl der Zellen	SCE	DIZ	RDM	
Versuch 1	50	7,35		50	19,63	1,33	1,46	
Versuch 2	50	6,96		50	21,06	0,92	2,18	
Mittelwert		7,16 \pm 0,25			20,34 \pm 0,51	1,13	1,82	

Tab. 10: DIZ und RDM in unmarkierten Zellen in Versuchen mit Biotin-dUTP-Substitution und Bestrahlung mit 4,8 Gy. Pro Versuchspunkt wurden 50 Zellen ausgewertet.

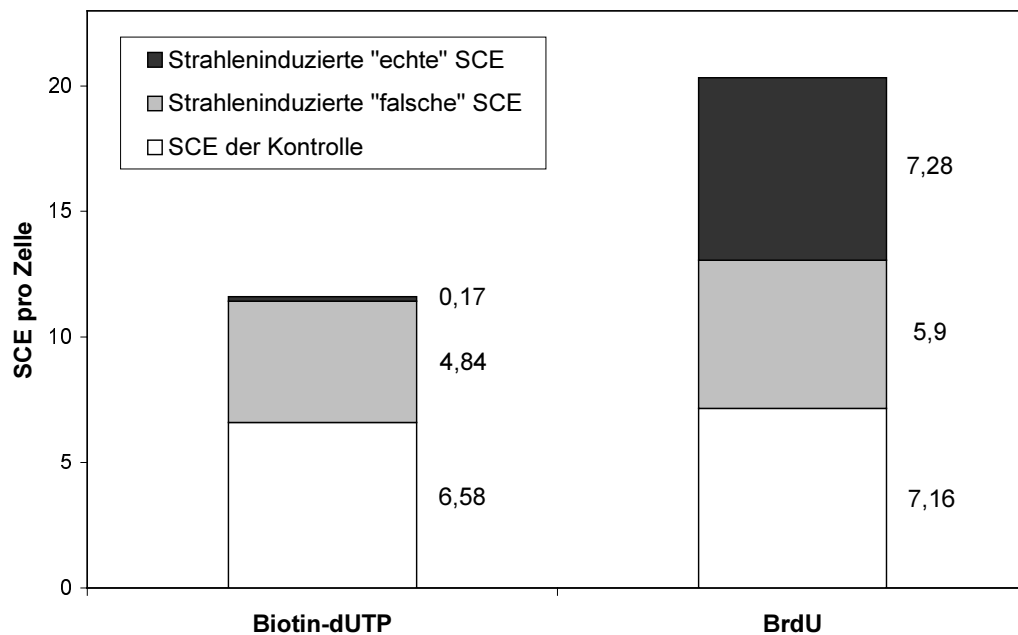
	DIZ	RDM
Versuch 1	0,84	1,40
Versuch 2	0,88	1,12
Mittelwert	0,86	1,26

Mit den ermittelten Frequenzen an SCE, DIZ und RDM können Berechnungen zur Bestimmung der Anzahl „falscher“ SCE durchgeführt werden, denen folgende Annahmen zugrunde liegen:

- Die Hälfte aller DIZ und reziproken Translokationen enthalten ein SCE an den Fusionsstellen.
- Reziproke Translokationen und DIZ kommen gleich häufig vor, so daß pro DIZ ein SCE berechnet werden kann.
- Ein reuniertes Fragment, das einem DIZ zugeordnet werden kann, enthält an den Fusionsstellen dann ein SCE, wenn das DIZ ebenfalls ein SCE an der Fusionsstelle trägt. Ebenso enthalten entweder beide translozierten Chromosomen ein SCE an der Fusionsstelle oder keines von beiden. Unter diesen Voraussetzungen kann ein DIZ mit zwei SCE gleichgesetzt werden.
- Die Anzahl der RDM entspricht der Anzahl der Inversionen, die in diesem experimentellen Ansatz jeweils zwei „falsche“ SCE ergeben, so daß pro RDM zwei SCE erklärt werden können.

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse dieser Berechnung. Nach Abzug der SCE des Kontrollwertes können 5,01 SCE in Biotin-dUTP-markierten Zellen als strahleninduziert angesehen werden. Über DIZ, Translokationen und Inversionen können 4,84 SCE als „falsch“ definiert werden. 4,8 Gy Röntgenstrahlen induzieren demnach in Biotin-dUTP-markierten Zellen lediglich 0,17 „echte“ SCE pro Zelle. Im Gegensatz dazu können in BrdU-markierten Zellen nach Abzug der SCE des Kontrollwertes und der „falschen“ SCE aufgrund von CA 7,28 SCE als „echt“ angenommen werden.

Abb. 13: SCE in CHO-Zellen nach 4,8 Gy Bestrahlung Biotin-dUTP- oder BrdU-substituierter CHO-Zellen. Zuordnung der SCE nach ihrer Herkunft als SCE der Kontrolle, als strahleninduzierte „falsche“ SCE und strahleninduzierte „echte“ SCE.

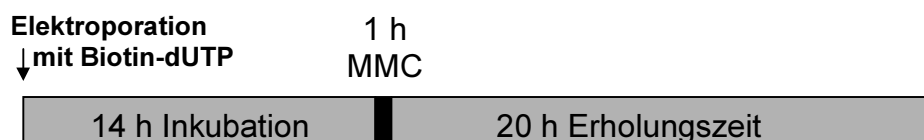


3.6 Einfluß von BrdU oder Biotin-dUTP auf die Entstehung von SCE nach Behandlung mit MMC

CHO-Zellen wurden nach folgenden Versuchsschemata behandelt:



oder



Aus drei unabhängigen Experimenten wurde je eine Dosis-Effekt-Beziehung für MMC nach Substitution mit 0,5 μM oder 20 μM BrdU erstellt. Die Zellen wurden mit 0,1 μM , 0,5 μM oder 1 μM MMC behandelt. Mit 20 μM BrdU substituierte Zellen wurden FPG-gefärbt und im Lichtmikroskop analysiert. Mit 0,5 μM BrdU markierte Zellen wurden

immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Kontrollen und Versuchspunkte mit 1 μM MMC nach Substitution mit 20 μM BrdU wurden auch fluoreszenzmikroskopisch auf SCE untersucht. Zusätzlich wurden zwei unabhängige Experimente mit Biotin-dUTP-Substitution oder Markierung mit 0,5 μM BrdU und einer Behandlung mit 0,1 μM MMC durchgeführt. Tab. 11 und 12 sowie Abb. 14 und 15 geben einen Überblick über die Ergebnisse, die wie folgt beschrieben werden können:

Bei den gewählten Konzentrationen von MMC werden nur selten CA beobachtet.

Für beide Konzentrationen von BrdU steigen die SCE-Frequenzen mit der Dosis von MMC an. Bei allen Behandlungspunkten sind die SCE gegenüber der jeweiligen Kontrolle signifikant erhöht (t-Test, $p < 0,01$).

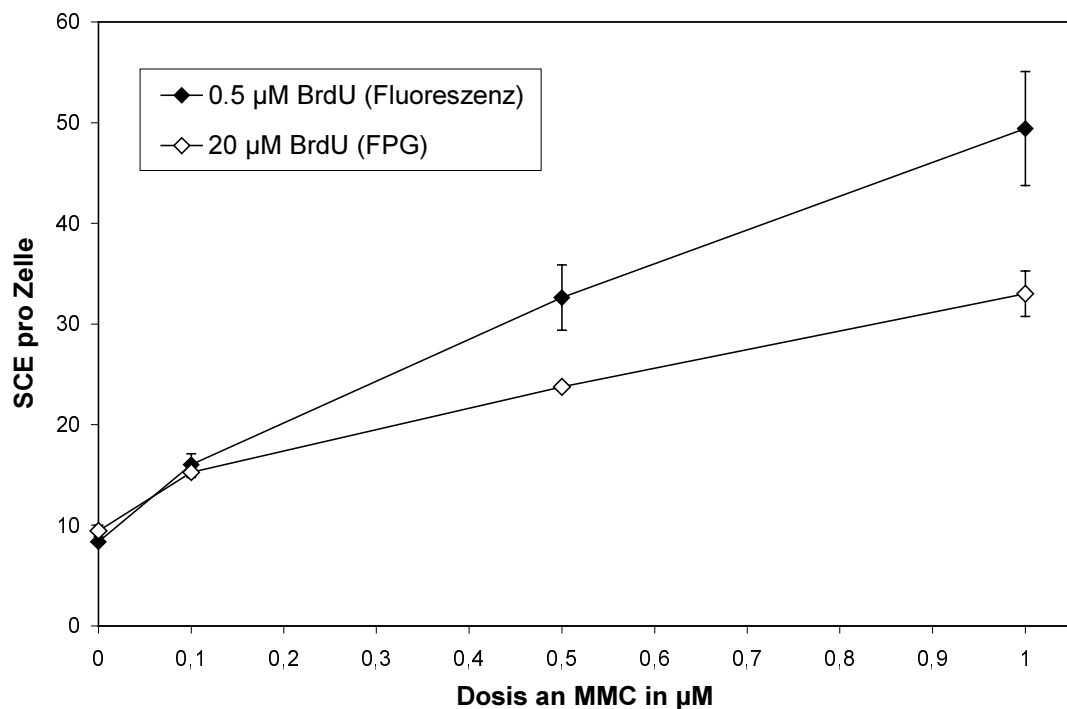
In allen Behandlungspunkten ist die Anzahl der SCE in den FPG-gefärbten, mit 20 μM BrdU substituierten Zellen gegenüber den fluoreszenzmikroskopisch analysierten, mit 0,5 μM BrdU markierten Zellen signifikant niedriger (t-Test, $p < 0,01$). Die jeweiligen Kontrollen sind ebenfalls signifikant verschieden, der Kontrollwert ist bei 20 μM BrdU leicht erhöht gegenüber der Kontrolle bei 0,5 μM BrdU. Zur genaueren Untersuchung dieses unerwarteten Ergebnisses wurden Präparate der Kontrollen und des Versuchspunkts mit 1 μM MMC nach Substitution mit 20 μM BrdU immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Werte für die Kontrollen mit 20 μM BrdU stimmen bei beiden Färbemethoden statistisch überein (t-Test, $p > 0,05$), die Ergebnisse mit 1 μM MMC nach Substitution mit 20 μM BrdU weichen jedoch in den beiden Färbemethoden signifikant voneinander ab, in FPG-gefärbten Präparaten wurden weniger SCE gefunden als mit dem Antikörnernachweis (t-Test, $p < 0,01$). Bei Analyse im Fluoreszenzmikroskop werden nach Behandlung mit 1 μM MMC für beide BrdU-Konzentrationen ähnliche SCE-Frequenzen gefunden (t-Test, $p > 0,05$).

Nach Korrektur der Werte für SCE in biotinylierten Zellen mit der Division durch 0,88 können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollwerten nach Substitution mit Biotin-dUTP oder 0,5 μM BrdU festgestellt werden (t-Test, $p > 0,05$). Nach Behandlung mit 0,1 μM MMC ist die SCE-Frequenz gegenüber der jeweiligen Kontrolle signifikant erhöht (t-Test, $p < 0,01$), die Häufigkeit der SCE nach Behandlung mit MMC ist in Biotin-markierten Zellen jedoch signifikant niedriger als nach BrdU-Substitution (t-Test, $p < 0,01$).

Tab. 11: Dosis-Effekt-Beziehung für SCE nach Substitution von CHO-Zellen mit 0,5 μ M oder 20 μ M BrdU und Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von MMC. Analyse nach FPG-Färbung (FPG) oder in Immunfluoreszenzmikroskopie (Fluoreszenz). Pro Versuchspunkt wurden 100 Zellen ausgewertet. Angegeben sind die mittleren SCE-Frequenzen und SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

Dosis in μ M	0,5 μ M BrdU (Fluoreszenz)	20 μ M BrdU (FPG)	20 μ M BrdU (Fluoreszenz)
0	8,35 \pm 0,18	9,44 \pm 0,56	9,77 \pm 0,56
0,1	16,01 \pm 1,10	15,28 \pm 0,51	
0,5	32,61 \pm 3,25	23,75 \pm 0,40	
1	49,42 \pm 5,67	33,03 \pm 2,27	50,48 \pm 0,04

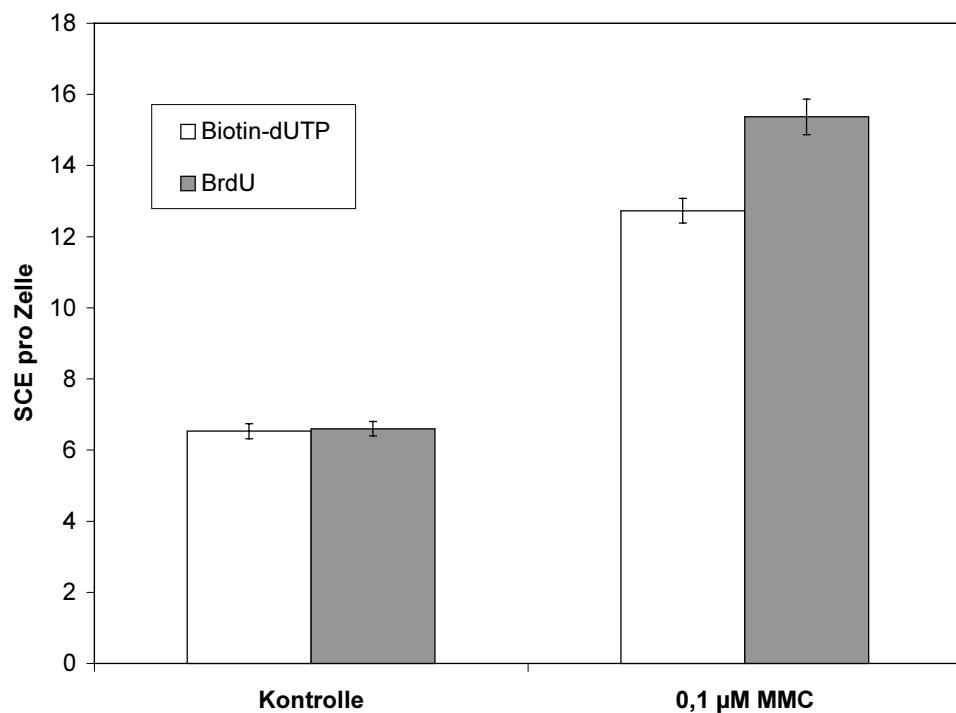
Abb. 14: Dosis-Effekt-Beziehung für MMC-induzierte SCE nach Substitution von CHO-Zellen mit 0,5 μ M BrdU und Immunfluoreszenzmikroskopie oder Markierung mit 20 μ M BrdU und FPG-Färbung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen und die SEM.



Tab. 12: SCE-Frequenzen nach Behandlung von unifilar mit Biotin-dUTP oder 0,5 µM BrdU substituierten CHO-Zellen mit 0,1 µM MMC. Aufgeführt sind die Einzelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen und die Mittelwerte mit SE. Die SCE-Werte in biotinylierten Zellen sind mit der Division durch 0,88 korrigiert.

Biotin-dUTP				
	Kontrolle		0,1 µM MMC	
	Anzahl der Zellen	SCE	Anzahl der Zellen	SCE
Versuch 1	50	6,54	50	12,80
Versuch 2	45	6,52	50	12,66
Mittelwert		6,53 ± 0,21		12,73 ± 0,35
0,5 µM BrdU				
	Kontrolle		0,1 µM MMC	
	Anzahl der Zellen	SCE	Anzahl der Zellen	SCE
Versuch 1	50	6,94	50	15,42
Versuch 2	50	6,26	50	15,32
Mittelwert		6,60 ± 0,20		15,37 ± 0,50

Abb. 15: SCE-Frequenzen nach Behandlung von unifilar mit Biotin-dUTP oder 0,5 µM BrdU substituierten CHO-Zellen mit 0,1 µM MMC. Dargestellt sind die mittleren Frequenzen an SCE und die SE.



3.7 Abbildungen von Metaphasen



Abb. 16: Differenziell gefärbte diploide CHO-Zelle nach Bestrahlung mit 4,8 Gy.



Abb. 17: Differenziell gefärbte tetraploide CHO-Zelle mit vielen RDM nach Bestrahlung mit 6 Gy.

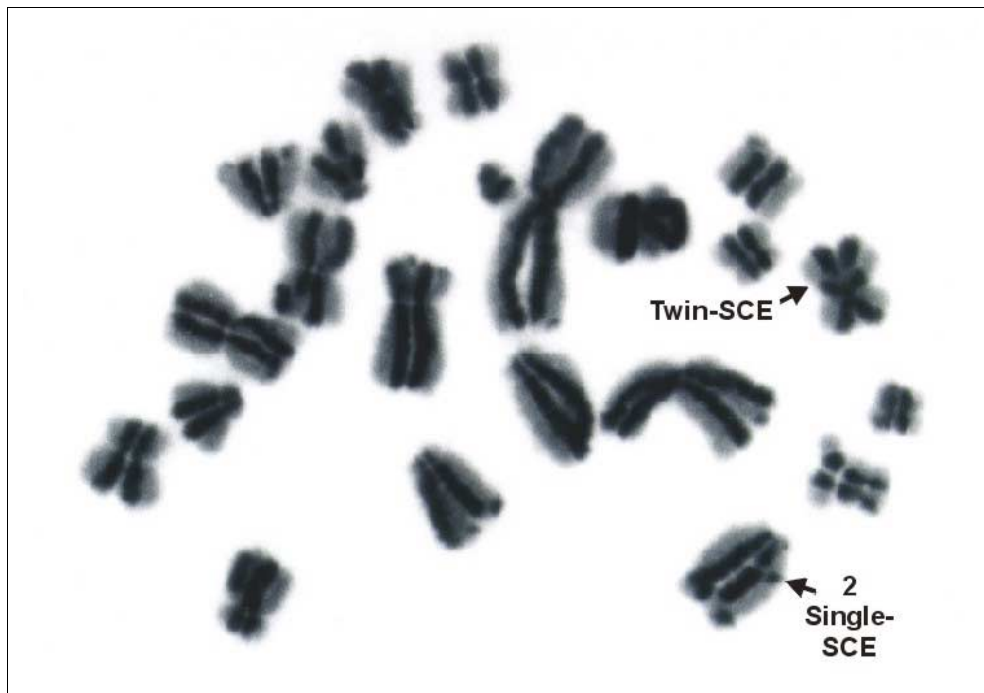


Abb. 18: *Twin-* und *Single-SCE* in 7BT-ER nach 3,6 Gy Röntgenbestrahlung.

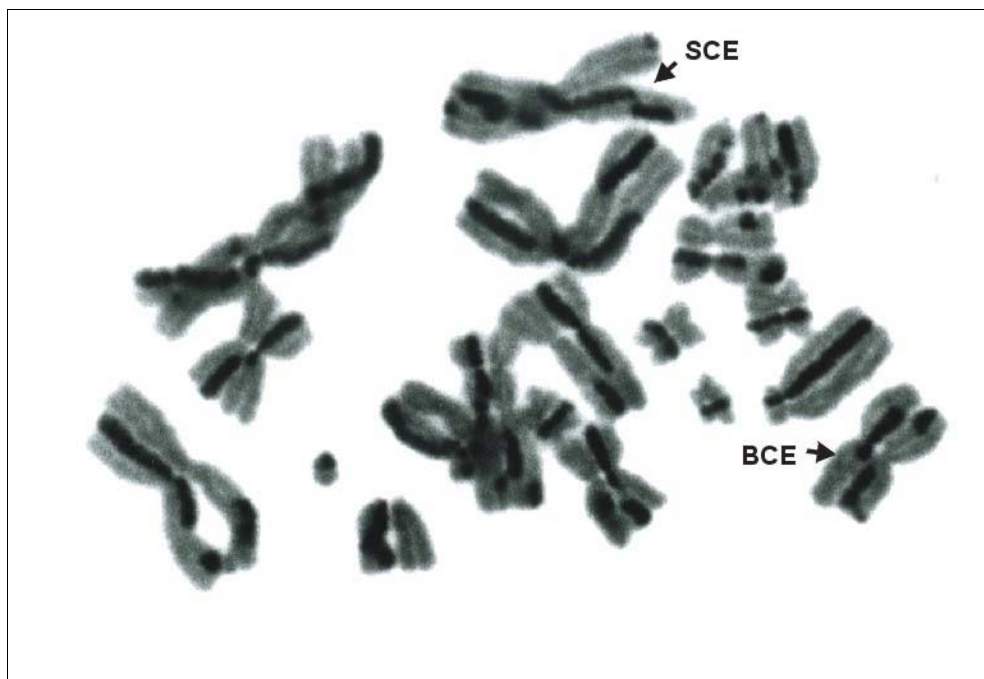


Abb. 19: BCE und SCE in B7BT-ER nach 3,6 Gy Röntgenbestrahlung.

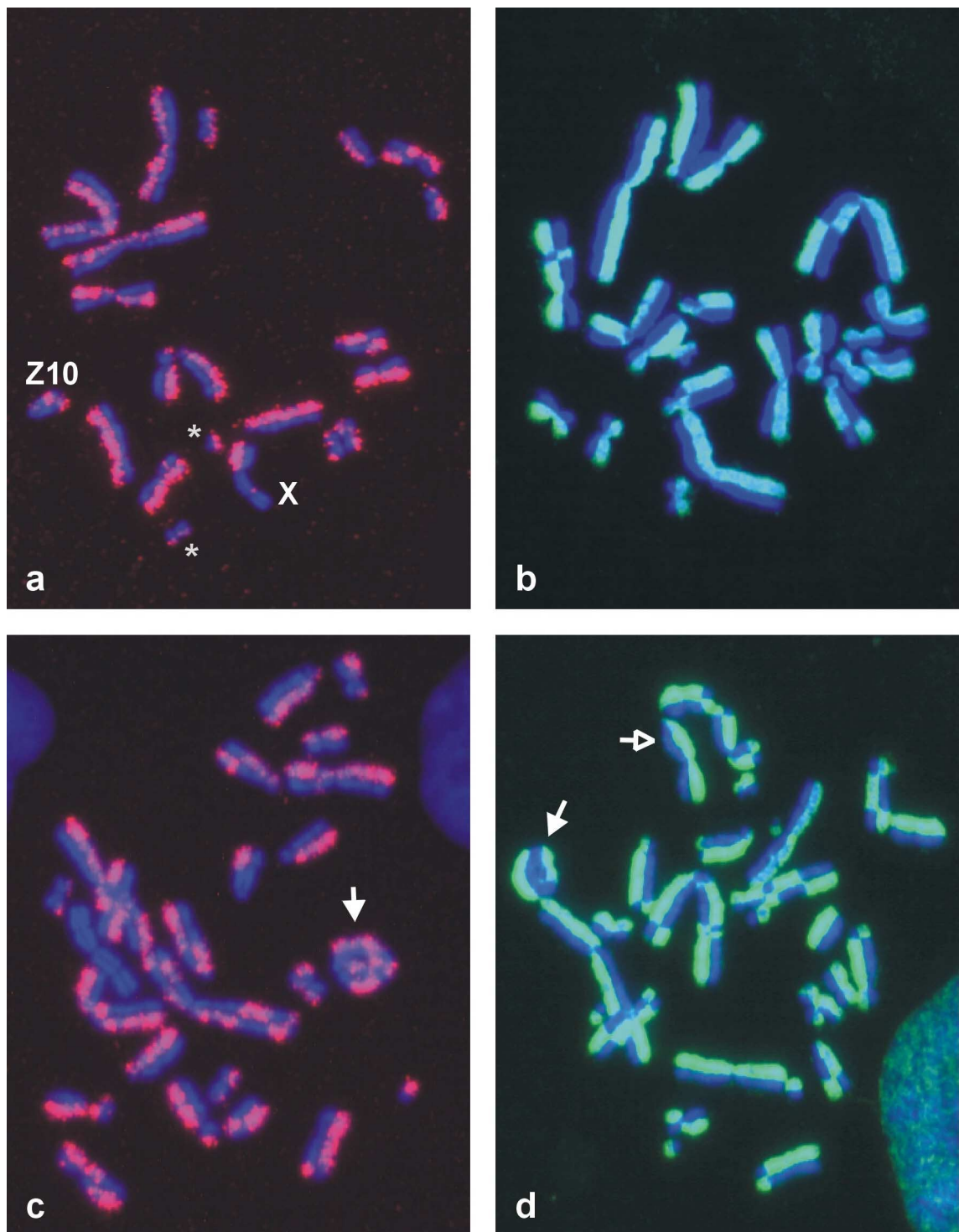


Abb. 20: Differenziell mit Biotin-dUTP (a und c) oder 0,5 µM BrdU markierte Zellen (b und d). Zellen der Kontrollen in (a) und (b), mit 4,8 Gy bestrahlte Zellen in (c) und (d). In (a) sind die von der Auswertung ausgeschlossenen Chromosomen X, Z10 und mit * Z12 und Z13 gekennzeichnet. In (c) ist das X-Chromosom vollständig unmarkiert. Gefüllte Pfeile deuten auf Ringchromosomen, der leere Pfeil weist auf ein DIZ.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluß der Substitution zellulärer DNS mit BrdU auf die SCE-Frequenz

Bestrahlung von unifilar mit 20 μM BrdU substituierten CHO-Zellen mit Dosen von 0 bis 4,8 Gy in der G1-Phase führt zu einer linear-quadratischen Dosis-Effekt-Beziehung für SCE (BRUCKMANN *et al.* 1999b). Verdopplung der SCE-Frequenz gegenüber der Kontrolle wird etwa bei 3 Gy erreicht. Sättigung zeigt sich ab 6 Gy, bei 7,2 Gy fällt die SCE-Frequenz wieder ab. Sättigung und Abfall können auf das Absterben von Zellen zurückgeführt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch PERRY und EVANS (1975) nach Röntgenbestrahlung von unifilar mit 10 μM BrdU substituierten CHO-Zellen, jedoch wurde in diesen Versuchen eine Verdopplung der SCE-Frequenzen erst bei 4 Gy erreicht. Diese Unterschiede können möglicherweise auf einem unterschiedlichen Substitutionsgrad mit BrdU beruhen. Eine höhere Substitution mit BrdU könnte zur Erhöhung der SCE nach Bestrahlung führen.

Die Versuche dieser Arbeit belegen diese Annahme. Bei Markierung der DNS mit 0,5 μM BrdU für 14 Stunden, Bestrahlung mit 4,8 Gy und einer Erholungszeit von 12 Stunden werden im Mittel etwa 20 SCE pro Zelle gefunden (BRUCKMANN *et al.* 1999b). In der mit 20 μM BrdU Substitution erstellten Dosis-Effekt-Beziehung induzieren 4,8 Gy Röntgenstrahlen etwa 33 SCE pro Zelle.

Auch die Häufigkeit der SCE in der Kontrolle ist nach Einsatz der niedrigen BrdU-Konzentration um etwa 2,5 SCE pro Zelle signifikant verringert. Eine Abhängigkeit der SCE-Frequenz von der BrdU-Konzentration wurde bereits mehrfach beschrieben (WOLFF und PERRY 1974, PINKEL *et al.* 1985, NATARAJAN *et al.* 1986). Weiterhin beeinflußt die BrdU-Dosis die Zellkinetik (MORRIS 1991), 20 μM BrdU verzögern den Zellzyklus deutlich stärker als 0,5 μM . Dies kommt in den unterschiedlichen Versuchszeiten zum Ausdruck, die notwendig sind, um möglichst viele differentiell markierte Metaphasen zu erhalten.

In Versuchen, in denen Lymphozyten in der G0-Phase mit Röntgen- oder γ -Strahlen behandelt und nachfolgend mit BrdU substituiert wurden, konnte keine signifikante Erhöhung der SCE-Frequenz beobachtet werden (LITTLEFIELD *et al.* 1979, MORGAN und

CROSSEN 1980). Die hier erhobenen Ergebnisse mit endoreduplizierten CHO-Zellen bestätigen diesen Befund.

ER ermöglichen die Zuordnung von SCE zu dem Zellzyklus, in dem sie entstanden sind. Im Versuch ∇ BT-ER wurden unsubstituierte Zellen in der G1-Phase mit 3,6 Gy bestrahlt, nachfolgend mit 20 μ M BrdU markiert und in der nächsten Mitose zur Induktion von ER mit Rotenon behandelt. Der endoreduplikative Zellzyklus erfolgte in Abwesenheit von BrdU. Bei dieser Versuchsanordnung bestehen die Diplochromosomen aus zwei differentiell gefärbten Chromosomen, deren dunkle Chromatide jeweils innen liegt (Abb. 3 und Abb. 18). SCE an gleicher Position in einem Diplochromosom werden als *Twin*-SCE bezeichnet, sie sind im ersten Zellzyklus entstanden. SCE des zweiten Zellzyklus stellen sich als *Single*-SCE dar. Nach Bestrahlung unsubstituierter Zellen in der G1-Phase sind weder die Frequenzen der *Twin*-SCE, noch der *Single*-SCE signifikant erhöht. Röntgenbestrahlung unsubstituierter CHO-Zellen in der G1-Phase induziert in keinem der beiden Zellzyklen SCE (BRUCKMANN *et al.* 1999b).

In den gleichen Präparaten fanden sich auch diploide Metaphasen mit differentieller Schwesterchromatidenfärbung, die zusätzlich auf SCE untersucht wurden. Die SCE-Frequenz der Kontrolle aus diesem Versuch entspricht etwa dem Kontrollwert aus der Dosis-Effekt-Beziehung, was darauf hinweist, daß die Induktion von ER mit Rotenon die Häufigkeit der SCE nicht beeinflußt. Genotoxizitätstests für Rotenon bestätigen, daß Rotenon weder SCE noch CA induziert (GUADAÑO *et al.* 1998).

Abweichend von den endoreduplizierten Zellen, zeigen die diploiden Metaphasen einen leichten, aber signifikanten Anstieg der SCE nach Bestrahlung vor Beginn der BrdU-Substitution. In diploiden Zellen verlief die erste Mitose im Gegensatz zu den ER regulär, so daß etwa DIZ und Ringchromosomen zu Anaphasebrücken führen konnten. Brüche in Anaphasebrücken wurden möglicherweise so repariert, daß BrdU-substituierte DNS-Einzelstränge mit unsubstituierten Einzelsträngen verknüpft wurden. Somit könnten in der folgenden S-Phase „falsche“ SCE entstanden sein.

WOLFF und AFZAL (1996) bestrahlten unsubstituierte CHO-Zellen, markierten sie nachfolgend für zwei S-Phasen mit BrdU und induzierten anschließend ER mit Rotenon. Die Diplochromosomen bestanden nach FPG-Färbung aus einem differenziert markierten und einem hellen Chromosom. Die Röntgenbestrahlung induzierte eine leichte Erhöhung der *inner-inner* BCE, die die Autoren aufgrund der Position des dunklen Chromatidensegments in der inneren Chromatide des ansonsten hellen Chromosoms dem ersten Zellzyklus

zuordneten und als Folge der S-Phase-abhängigen Reparatur von Basenschäden interpretierten. Diese Basenschäden hätten aber in dem oben beschriebenen Versuch γ BT-ER zu einer leichten Zunahme der *Twin*-SCE führen müssen. Weil die erste Mitose in den Experimenten von WOLFF und AFZAL (1996) nicht unterdrückt wurde, könnten die beschriebenen SCE auch auf die Reparatur von Brüchen in Anaphasebrücken zurückgeführt werden. Somit entstehen „falsche“ SCE, die vergleichbar mit den SCE infolge CA nach Röntgenbestrahlung in der zweiten G1-Phase sind. In Abb. 4 kann im Schema am Beispiel einer Inversion verfolgt werden, wie in der zweiten G1-Phase entstandene CA zu BCE führen, die dann fälschlicherweise als SCE des ersten Zellzyklus gewertet werden können.

Unterschiedliche quantitative Ergebnisse für Lymphozyten und CHO-Zellen dürften auf unterschiedlichen Sensibilitäten der Zellen gegenüber Strahlenschäden beruhen.

Beim Vergleich der SCE-Frequenzen des ersten und zweiten Zellzyklus fällt auf, daß die Anzahl der *Single*-SCE, auch nach der Division durch zwei, deutlich höher liegt als die Zahl der *Twin*-SCE. Dies stimmt mit Ergebnissen von MORALES-RAMÍREZ *et al.* (1987) überein, die in einer *in vivo*-Studie in Knochenmarkzellen der Maus die Abhängigkeit der SCE-Frequenz von der BrdU-Konzentration mit einer dreistufigen Schwesterchromatiden-differenzierung untersuchten. Dieses Verfahren erlaubt die Zuordnung von SCE zu dem Zellzyklus, in dem sie entstanden, über insgesamt drei Zellzyklen. MORALES-RAMÍREZ *et al.* (1987) fanden deutlich weniger SCE im ersten Zellzyklus gegenüber den beiden folgenden. Diese Versuche bestätigen, daß vermehrt dann SCE entstehen, wenn BrdU-substituierte DNS repliziert wird (NATARAJAN *et al.* 1981, ZWANENBURG und NATARAJAN 1984).

Hinsichtlich der Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen läßt sich zusammenfassend festhalten, daß SCE nur in BrdU-substituierten Zellen induziert werden. Die SCE-Frequenz nach Bestrahlung wird von der Konzentration des BrdU beeinflusst. Die Frage ist nun, ob sich alle strahleninduzierten SCE auf BrdU zurückführen lassen.

4.2 Überprüfung der Hypothese der „falschen“ SCE nach ionisierender Bestrahlung

Röntgen- und γ -Strahlen gelten als schwache SCE-Induktoren, weil die zur Verdopplung der SCE-Frequenzen notwendigen Dosen bereits eine deutliche Erhöhung von CA verursachen (PERRY und EVANS 1975). Die Vermutung liegt daher nahe, daß es einen Zusammenhang zwischen CA und SCE nach Bestrahlung geben könnte. Wenn unifilar substituierte Chromosomen bestrahlt werden, können CA entstehen, in denen markierte und unmarkierte DNS-Einzelstränge rekombiniert werden. Die Verknüpfung zeigt sich nach einer S-Phase in der folgenden Mitose als SCE. Statistisch müssen die Hälfte aller DIZ und reziproken Translokationen an den Fusionsstellen ein, jede Inversion zwei SCE aufweisen. Unter der Voraussetzung, daß DIZ und reziproke Translokationen gleich häufig auftreten, könnte einem DIZ ein SCE entsprechen. Unter der Annahme, daß die Häufigkeit der Inversionen einerseits, und der RDM andererseits übereinstimmt, können für jeden RDM zwei SCE berechnet werden. MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) ermittelten auf diese Weise die Frequenz „falscher“ SCE nach γ -Bestrahlung unifilar BrdU-substituierter menschlicher Fibroblasten und kamen zu dem Schluß, daß ionisierende Strahlen keine „echten“, sondern ausschließlich „falsche“ SCE als Folge von CA induzieren. Eine besondere Bedeutung bei der Entstehung „falscher“ SCE kommt nach MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) den Inversionen zu, auf denen der größte Anteil der strahleninduzierten „falschen“ SCE beruhen soll.

Die Gültigkeit dieser Hypothese der „falschen“ SCE nach Bestrahlung soll hier überprüft werden.

Bei der Analyse der Dosis-Effekt-Beziehung wurden parallel zu den SCE auch RDM ausgewertet, die in differentiell markierten Metaphasen sicher erkannt werden können. Die RDM folgen, wie SCE, einer linear-quadratischen Dosis-Effekt-Beziehung (Abb. 6). Die quantitativen Daten zeigen, daß es unmöglich ist, alle SCE auf Inversionen zurückzuführen (BRUCKMANN *et al.* 1999b). Nach Bestrahlung BrdU-substituierter Zellen mit 4,8 Gy werden durchschnittlich 33 SCE pro Zelle gefunden. Nach Abzug der etwa zehn SCE in der Kontrolle verbleiben 23 SCE, die somit strahleninduziert sein sollten. Bei der gleichen Dosis werden annähernd vier RDM pro Zelle induziert, so daß dementsprechend auch vier Inversionen vorliegen sollten, die hier jedoch nicht sichtbar werden. An den Fusionsstellen der Inversion sollten zwei SCE auftreten. Folglich können maximal acht der 23 strahleninduzierten SCE mit Inversionen erklärt werden.

Die Berechnung zeigt, daß nur wenige der strahleninduzierten SCE auf Inversionen beruhen. Dieser Befund steht damit prinzipiell in Einklang mit Untersuchungen zur Häufigkeit von Inversionen nach Röntgenbestrahlung.

WOJCIK *et al.* (1999) verwendeten eine DNS-Sonde für die Region p14 des menschlichen Chromosoms 3 in Kombination mit Anti-BrdU-Antikörpern zur Untersuchung von strahleninduzierten SCE in menschlichen Lymphozyten. Diese Methode ermöglicht die Unterscheidung „echter“ von „falschen“ SCE als Folge para- oder perizentrischer Inversionen. Parazentrische Inversionen betreffen nur einen Arm des Chromosoms und können, wenn eine Bruchstelle zwischen Zentromer und Sonde gelegen hat, an der Lageverschiebung der Sonde in bezug auf das Zentromer erkannt werden. Perizentrische Inversionen können die Position des Zentromers innerhalb des Chromosoms verändern. Die Ergebnisse von WOJCIK *et al.* (1999) deuten darauf hin, daß die meisten strahleninduzierten SCE nicht auf Inversionen beruhen.

JOHANNES *et al.* (1999) benutzten ein spezielles, hochauflösendes Verfahren mit Vielfarbendarstellung des menschlichen Chromosoms 5, die *high-resolution multicolour banding fluorescence in situ hybridization* (mBAND). Diese Methode erlaubt eine präzise Analyse von einfachen und komplexen CA, einschließlich peri- und parazentrischer Inversionen. Nach Röntgenbestrahlung von menschlichen Lymphozyten mit 4 Gy wurden in 293 Zellen jeweils in den beiden Chromosomen 5 insgesamt 125 einfache oder komplexe Aberrationen gefunden, von denen nur sieben Inversionen waren.

Inversionen machen somit nicht den Hauptanteil der strahleninduzierten SCE aus. Jedoch ist damit nicht ausgeschlossen, daß nach Röntgenbestrahlung von BrdU-substituierten Zellen alle induzierten CA zusammen vielleicht die gesamte Anzahl an induzierten SCE erklären könnten. Es wäre somit wichtig, „falsche“ SCE als Konsequenz von CA von „echten“, S-Phase-abhängigen SCE unterscheiden zu können.

Im Versuch ∇ BT-ER kann untersucht werden, ob SCE nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase S-Phase-abhängig entstehen. Abb. 3 verdeutlicht die unterschiedlichen Resultate im Hinblick auf die Entstehung von SCE, einmal unter der Annahme, daß Röntgenstrahlen Läsionen hervorrufen, die in der nächsten S-Phase zur Bildung von SCE führen und sich als *Twin*-SCE im Diplochromosom zeigen (Hypothese A), oder im zweiten Fall unter der Annahme, daß Röntgenstrahlen DSB induzieren, die noch in der G1-Phase in Form von CA repariert werden (Hypothese B). Weil im Versuch ∇ BT-ER unsubstituierte Zellen bestrahlt werden, kann bei der Bildung von CA in der G1-Phase keine Rekombination von

markierten und unmarkierten DNS-Einzelsträngen stattfinden, so daß CA in diesem Versuch nicht zu „falschen“ SCE führen. Nach Röntgenbestrahlung von unsubstituierten Zellen, nachfolgender Markierung mit BrdU und Induktion vor ER mit Rotenon kann keine Erhöhung der *Twin*-SCE und *Single*-SCE nachgewiesen werden.

Im Versuch B ∇ BT-ER wurde der experimentelle Ansatz der ER-Versuche so abgewandelt, daß sowohl „echte“ als auch „falsche“ SCE sichtbar wurden. Die Zellen wurden eine S-Phase mit BrdU vormarkiert, die Bestrahlung erfolgte in der zweiten G1-Phase, die zweite S-Phase verlief ebenfalls in Anwesenheit von BrdU, und in der zweiten Mitose wurden ER induziert. Die Diplochromosomen bestehen nach FPG-Färbung jeweils aus einem differentiell markierten und einem hell gefärbten Chromosom, die dunkle Chromatide liegt in der Regel innen. SCE des ersten und zweiten Zellzyklus sind als BCE erkennbar, dunkle Segmente in dem ansonsten hellen Chromosom. Typische SCE innerhalb eines Chromosoms entstanden im dritten Zellzyklus (Abb. 19). Das Schema in Abb. 4 zeigt, daß CA, wie zum Beispiel Inversionen, ebenso zu BCE führen wie S-Phase-abhängige Läsionen. Die „echten“ SCE des zweiten Zellzyklus zeigen sich als BCE zur äußeren Chromatide des Diplochromosoms, die in der Terminologie von WOLFF und AFZAL (1996) *inner-outer* BCE genannt werden. Im Gegensatz dazu führen „falsche“ SCE infolge von CA in der zweiten G1-Phase zu BCE, in denen das dunkle Segment zur inneren Chromatide des hellen Chromosoms wechselt, sogenannte *inner-inner* BCE. „Echte“ *inner-inner* BCE entsprechen SCE des ersten Zellzyklus. Folglich erscheinen „falsche“ SCE der zweiten G1-Phase wie „echte“ SCE des ersten Zellzyklus. Auf die theoretisch mögliche Unterscheidung dieser beiden Typen an BCE wurde hier jedoch verzichtet.

In B ∇ BT-ER ist die Anzahl der BCE gegenüber der Kontrolle annähernd verdoppelt. Die Frequenzen der SCE von Kontrolle und Behandlung weichen jedoch nicht signifikant voneinander ab (BRUCKMANN *et al.* 1999b). Die SCE-induzierende Wirkung der Bestrahlung beschränkt sich demnach auf den ersten Zellzyklus nach der Behandlung.

Für B ∇ BT-ER kann ein Vergleich mit diploiden Zellen vorgenommen werden. Die Anzahl der BCE setzt sich zusammen aus den SCE des ersten und zweiten Zellzyklus und entspricht damit prinzipiell dem Verhältnis in diploiden Zellen. Die Anzahl der BCE nach 3,6 Gy in der zweiten G1-Phase beträgt im Mittel 19. In der Dosis-Effekt-Beziehung wurden ebenfalls unifilar BrdU-substituierte Zellen bestrahlt, der Wert für 3,6 Gy liegt hier

bei 24 SCE pro Zelle. Eine geringere Häufigkeit von SCE in ER wurde bereits mehrfach beschrieben (SPEIT *et al.* 1984, 1985, MESCHINI *et al.* 1996).

Die BCE in B ∇ BT-ER setzen sich aus den SCE des ersten und zweiten Zellzyklus zusammen. Die Anzahl der im ersten Zellzyklus entstandenen SCE beträgt in ∇ BT-ER 3,6 SCE pro Zelle. Damit können in B ∇ BT-ER 6,8 SCE für den zweiten Zellzyklus berechnet werden. Der im Vergleich mit dem ersten Versuch mit ER etwas höhere Wert für SCE des zweiten Zellzyklus könnte darin begründet sein, daß in diesem Fall auch in der zweiten S-Phase BrdU eingebaut wurde. Die SCE des dritten Zellzyklus sind ausschließlich in den differenziert markierten Chromosomen der Diplochromosomen erkennbar, so daß eine Korrektur auf den diploiden Chromosomensatz entfällt. Im dritten Zellzyklus entstanden etwa 7,4 SCE. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die SCE-Frequenz immer dann beeinflußt wird, wenn die DNS-Replikation an einer BrdU-haltigen Matrize erfolgt. Für die BrdU-abhängige Induktion von SCE scheint es jedoch kaum von Bedeutung zu sein, ob einer oder beide Matrizen BrdU-substituiert sind (NATARAJAN *et al.* 1981, ZWANENBURG and NATARAJAN 1984, KAUFMAN 1986).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß Röntgenstrahlen in unsubstituierten CHO-Zellen offensichtlich keine S-Phase-abhängigen Läsionen induzieren, die zu SCE führen könnten. „Falsche“ SCE als Folge von CA werden nicht ausgeprägt, weil während der Reparatur in der G1-Phase noch kein BrdU inkorporiert war. Nach Bestrahlung von unifilar BrdU-substituierten Zellen, einer weiteren S-Phase mit BrdU und Induktion von ER werden sowohl „echte“, S-Phase-abhängige SCE als auch „falsche“ SCE als BCE sichtbar. Die Frequenz der BCE ist nach Bestrahlung deutlich erhöht. Aus diesen Ergebnissen könnte abgeleitet werden, daß tatsächlich alle SCE nach Röntgenbestrahlung auf CA beruhen. Diese Schlußfolgerung läßt jedoch einen entscheidenden Unterschied zwischen den beiden Versuchen außer acht, denn im ersten Experiment wurden unsubstituierte, im zweiten unifilar BrdU-substituierte Zellen bestrahlt. Die Beeinflussung der Frequenz strahleninduzierter SCE aufgrund des inkorporierten BrdU ist bereits bekannt (MORRIS 1991). Das Ausmaß dieses Einflusses konnte aber bislang noch nicht eindeutig bestimmt werden.

4.3 Substitution zellulärer DNS mit Biotin-dUTP

Die Strahlensensibilität des BrdU beruht auf einer verstärkten Radikalbildung im Uracyl-Rest nach Abspaltung des Broms (HUTCHINSON 1973, MORRIS 1991). Die Radikalisierung kann auf die Desoxyribose übergreifen und zum Strangbruch führen (SCHULTE-

FROHLINDE 1990). Zur Untersuchung strahleninduzierter SCE wäre es demnach sinnvoll, ein Nukleotid zur Markierung einzusetzen, das unter Bestrahlung keine radikalische Dissoziation zeigt. Zusätzlich müßte dieses Nukleotid folgenden Kriterien entsprechen:

- Das Nukleotid muß Schwesterchromatidendifferenzierung erlauben.
- Die Aufnahme in die Zelle muß gewährleistet sein.
- Das Nukleotid muß während der Replikation in die DNS eingebaut werden und darf die Replikation nicht stören.
- Das Nukleotid sollte nicht von Reparaturprozessen entfernt werden.

Ein käuflich zu erwerbendes Nukleotid, das diesen Ansprüchen genügt, ist das Biotin-dUTP. Die chemische Struktur des Biotins macht eine Radikalbildung unwahrscheinlich. Biotinylierte Nukleotide werden zur Markierung isolierter DNS, zum Beispiel bei der *fluorescence in situ hybridization* (FISH), eingesetzt. Die erste Anwendung von Biotin-dUTP in lebenden Zellen zum Nachweis der Exzisionsreparatur nach ultravioletter Bestrahlung wurde von HUNTING *et al.* (1985) beschrieben. HUIJZER und SMERDON (1992) berichteten, daß während der Exzisionsreparatur eingebautes Biotin-11-dUTP in nicht-proliferierenden Zellen über 48 Stunden ohne Abschwächung nachweisbar blieb; nach 72 Stunden hatte die Markierung um etwa 30 % abgenommen. Nach HUIJZER und SMERDON (1992) wurde das Biotin-11-dUTP jedoch in proliferierenden Zellen schnell aus der DNS entfernt. HIRIYANNA *et al.* (1988) mikroinjizierten biotinylierte Nukleotide in Eier des Krallenfroschs *Xenopus laevis* und zeigten, daß nach der Replikation bis zu 12 % der eingebauten Nukleotide biotinyliert sein können. Die Biotin-markierten Nukleotide unterliegen keiner extensiven Reparatur und behindern nur geringfügig die nachfolgende Replikation, in der sie als Matrize dienen. Die Biotin-tragenden Seitenketten beeinflussen jedoch Masse und Form der DNS (HIRIYANNA *et al.* 1988). Wichtige Erkenntnisse über den Ablauf der eukaryoten Replikation wurden mit Hilfe der Inkorporation von Biotin-dUTP in lebenden Zellen gewonnen (NAKAYASU und BEREZNEY 1989, BANFALVI *et al.* 1989, 1990, JACKSON 1995).

Avidin, ein 68 000 Dalton schweres Glykoprotein aus Hühnereiweiß (GREEN 1975), zeigt eine hohe Affinität zu Biotin. Das Avidin kann, mit Fluorochromen konjugiert, zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Biotin verwendet werden.

Biotin-dUTP kann wegen des Triphosphats die Zellmembran von Säugerzellen nicht frei passieren. Permeabilisation der Zellmembran ist mit verschiedenen Chemikalien, wie zum Beispiel Lysolecithin, Streptolysin O, oder Triton X, möglich. Als besonders effektives

Permeabilisationsverfahren hat sich die Elektroporation erwiesen (WINEGAR *et al.* 1989, WEISSENBORN *et al.* 1994).

Mit Hilfe der Elektroporation wurden CHO-Zellen für Biotin-dUTP permeabilisiert. Bei Fixierung mitotischer Zellen 26 Stunden nach der Elektroporation, Nachweis des inkorporierten Biotin-dUTP mit TRITC-konjugiertem Avidin und Gegenfärbung mit DAPI zeigten bis zu 10 % der Metaphasen eine deutliche Schwesterchromatiden-differenzierung (BRUCKMANN *et al.* 1999a).

Obwohl die Fluoreszenzfärbung häufig körnig und nicht gleichmäßig erscheint, können auch eng beieinander liegende SCE erkannt werden. Der lange, heterochromatische Arm des X-Chromosoms und ein zentromernaher Bereich des Chromosoms Z10 sind in der Regel nicht markiert (Abb. 20). Diese Chromosomenabschnitte enthalten spätreplizierende Regionen, was darauf hinweist, daß die intrazelluläre Konzentration an Biotin-dUTP nicht für die gesamte Replikationsrunde ausreicht. Auch eine Erhöhung der Konzentration des Biotin-dUTP von 20 auf 30 μM während der Elektroporation führte nicht zu einer homogenen Färbung. Möglicherweise unterliegen die freien biotinylierten Nukleotide einem relativ raschen Abbau (BRUCKMANN *et al.* 1999a).

Die von der Auswertung ausgeschlossenen Chromosomen X, Z10, Z12 und Z13 umfassen etwa 12 % des Genoms. Damit die Biotin-dUTP- mit den BrdU-Daten verglichen werden konnten, wurden die Frequenzen für SCE in Biotin-markierten Zellen mit der Division durch 0,88 korrigiert (BRUCKMANN *et al.* 1999a). Unter der Annahme, daß alle Chromosomen gleichmäßig an der Bildung von SCE beteiligt sind, beträgt die berechnete Frequenz der SCE in Biotin-dUTP-markierten CHO-Zellen etwa 6,6 SCE pro Zelle. Dies entspricht etwa der Häufigkeit von SCE in differentiell markierten CHO-Zellen nach Substitution mit 0,5 μM BrdU (BRUCKMANN *et al.* 1999b). Spontane SCE-Frequenzen in CHO-Zellen nach Analyse von Ringchromosomen (SUTOU 1981) oder nach Substitution der DNS mit weniger als 1 % BrdU (NATARAJAN *et al.* 1986) werden mit zwei SCE pro Zelle pro Zellzyklus angegeben, was vier SCE in einer differenziert markierten Metaphase entspricht. Die höhere Anzahl an SCE nach Markierung mit Biotin-dUTP könnte bedeuten, daß die Substitution mit dem biotinylierten Nukleotid einige SCE induziert, möglicherweise aufgrund sterischer Behinderung der Replikation (BRUCKMANN *et al.* 1999a). Es ist auch nicht auszuschließen, daß die Elektroporation SCE induziert. SCHUNCK (1997) beobachtete ungefähr 1,8 zusätzliche SCE pro Zelle nach Elektroporation von unifilar BrdU-substituierten CHO-Zellen. Allerdings wurden hier unmarkierte CHO-Zellen

elektroporiert. Der Einfluß der Elektroporation auf die Entstehung von SCE in diesen Versuchen bleibt daher unklar.

4.4 Röntgenstrahlen induzieren „echte“ und „falsche“ SCE in BrdU-substituierten Zellen, aber nur „falsche“ SCE in Biotin-dUTP-markierten Zellen

Die Methode der Schwesterchromatidendifferenzierung mit Biotin-dUTP wurde zu vergleichenden Untersuchungen der SCE-Frequenzen in Biotin-dUTP- oder BrdU-substituierten Zellen nach Röntgenbestrahlung eingesetzt. Die Konzentration des BrdU während der Präinkubation betrug 0,5 µM. Bei dieser Konzentration war eine Differenzierung mit der FPG-Methode nicht mehr sicher möglich. Daher wurden BrdU-Antikörper eingesetzt, die immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurden. Die Frequenzen der Kontrollen in Biotin-dUTP- und BrdU-markierten Zellen unterscheiden sich nicht signifikant. Dies erleichtert den Vergleich der SCE-Frequenzen nach Bestrahlung. Die SCE-Frequenzen sind nach Bestrahlung mit 4,8 Gy in BrdU-substituierten Zellen annähernd dreifach, in Biotin-dUTP-substituierten Zellen lediglich 1,8fach erhöht (BRUCKMANN *et al.* 1999b).

Die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung in Kombination mit DAPI ermöglicht neben der SCE-Analyse auch die Untersuchung von DIZ und RDM in BrdU- oder Biotin-dUTP-markierten und in unmarkierten Zellen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Häufigkeiten von DIZ und RDM zwischen unmarkierten und markierten Zellen. Substitution mit Biotin-dUTP oder 0,5 µM BrdU beeinflusst somit nicht die Entstehung strahleninduzierter CA.

DIZ und RDM können für eine Abschätzung der Frequenz „falscher“ SCE genutzt werden. Unter Voraussetzung einer gleichen Häufigkeit von Inversionen und RDM werden für jeden RDM zwei SCE berechnet. Die Annahmen für die Berechnung „falscher“ SCE in DIZ und Translokationen weichen von MÜHLMANN-DÍAZ und BEDFORD (1995) ab und sollen daher kurz begründet werden. Die Analyse der DIZ in BrdU- und Biotin-markierten Zellen zeigt in etwa 50 % der DIZ mindestens ein SCE in der Region zwischen den beiden Zentromeren. Diese SCE könnten das Ergebnis der Verknüpfung BrdU-substituierter und unsubstituierter DNS-Einzelstränge bei der Bildung der DIZ sein und sind somit „falsch“. Dem DIZ kann häufig ein reunitiertes Fragment zugeordnet werden. Aufgrund der

Antiparallelität der DNS enthält dieses Fragment dann ein SCE, wenn das DIZ ebenfalls ein SCE an der Fusionsstelle trägt. Unter diesen Bedingungen wird pro DIZ ein SCE angenommen. Für reziproke Translokationen gilt ebenfalls, daß entweder beide translozierten Chromosomen ein SCE an den Fusionsstellen zeigen oder keines, so daß für jede reziproke Translokation ein „falsches“ SCE zu erwarten ist. Unter der Annahme, daß sich reziproke Translokationen zu DIZ wie 1 : 1 verhalten, können jedem DIZ zwei „falsche“ SCE zugeordnet werden.

Sollte das Verhältnis von Translokationen zu DIZ > 1 sein (siehe JOHANNES *et al.* 1999), wäre die Häufigkeit „falscher“ SCE entsprechend höher.

Abb. 13 zeigt das Ergebnis dieser Berechnung der „falschen“ SCE nach 4,8 Gy Röntgenbestrahlung für Biotin-dUTP- und BrdU-substituierte CHO-Zellen. Nach Abzug der SCE der Kontrolle können 5,01 SCE in Biotin-dUTP-markierten Zellen als strahleninduziert angenommen werden, von denen 4,84 „falsch“ sind, weil sie auf DIZ, Translokationen und Inversionen beruhen könnten. Somit wurden in Biotin-dUTP-markierten Zellen lediglich 0,17 „echte“ SCE pro Zelle induziert. In BrdU-markierten Zellen können nach Abzug der SCE der Kontrolle 13,18 SCE als strahleninduziert bestimmt werden. 5,9 „falsche“ SCE abgezogen, bleiben 7,28 „echte“ SCE in BrdU-substituierten Zellen übrig.

Obwohl die verschiedenen Typen komplexer CA nicht in die Berechnung mit einbezogen wurden, können nahezu alle strahleninduzierten SCE in Biotin-markierten Zellen, aber nicht in BrdU-substituierten Zellen als „falsche“ SCE definiert werden.

Es ist allgemein akzeptiert, daß SCE Ereignisse der S-Phase sind und auf verschiedenartigen Läsionen in der DNS beruhen (PERRY und EVANS 1975, EVANS 1977, KATO 1977, SHAFER 1977, ISHII und BENDER 1980, PERRY 1980, CLEAVER 1981, SCHUBERT 1990, TUCKER *et al.* 1993, AFZAL *et al.* 1995, CLEAVER *et al.* 1996, WOLFF und AFZAL 1996, KAINA *et al.* 1997). Tatsächlich scheint ein größerer Anteil der strahleninduzierten SCE BrdU-abhängig in der S-Phase gebildet zu werden. Die Entstehung von SCE nach Bestrahlung BrdU-substituierter Zellen in der G1-Phase beruht vermutlich auf der Bildung freier Radikale nach Abspaltung des Broms.

Unter ionisierender Bestrahlung entstehen in der Hydrathülle der DNS Hydroxylradikale (WARD 1994). Die radikalische Dissoziation des BrdU nach Bestrahlung könnte somit auch über die Reaktion mit einem Hydroxylradikal eingeleitet werden, die von der

Reaktionsfreudigkeit des Halogens begünstigt wird. Dieser Mechanismus könnte die Strahlensensibilisierung der DNS aufgrund der Inkorporation des BrdU erklären. Eine Debromination des BrdU kann über eine radikalische Reaktionskette zu einem DNS-Einzelstrangbruch führen (HUTCHINSON 1973, MORRIS 1991). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß das nach Abspaltung des Broms verbleibende Uracil von dem Reparaturenzym Uracilglycosylase erkannt und herausgeschnitten wird (MAKINO und MUNAKATA 1979). Die Sekundärschäden unterliegen aber offenbar keiner weiteren Reparatur bis zur S-Phase, in der sie zur Bildung von SCE führen können.

Strahleninduzierte SCE in unifilar BrdU-substituierten Zellen setzen sich somit zusammen aus „falschen“ SCE infolge CA und aus „echten“, aber BrdU-abhängigen SCE. Die „falschen“ SCE beruhen auf CA, die aus zwei Trefferereignissen hervorgehen können (SAX 1938). Dies könnte die linear-quadratische Abhängigkeit der SCE-Frequenzen von der Strahlendosis erklären.

Andere Agenzien, die wie ionisierende Strahlen DSB induzieren, wie Endonukleasen, Bleomycin und Neokarzinostatin, induzieren in der G1-Phase ebenfalls nur in BrdU-substituierten Zellen SCE (PERRY und EVANS 1975, AU *et al.* 1984, OBE *et al.* 1994, SCHUNCK und OBE 1995). Hier kann eher nicht erwartet werden, daß BrdU von diesen Agenzien radikalisiert wird. Möglicherweise sind die von diesen Agenzien induzierten SCE alle „falsch“. Experimentelle Analysen zur Klärung dieser Frage wurden bisher nicht durchgeführt.

4.5 Röntgenstrahlen induzieren langlebige Schäden in BrdU-substituierter DNS

Inkorporiertes BrdU sensitiviert die Zelle für die Induktion von SCE mit Röntgenstrahlen. In der G1-Phase induzierte Läsionen im BrdU unterliegen offenbar keiner Reparatur bis zur S-Phase, in der sie zu SCE führen.

Zur Untersuchung der Fragestellung, wie sich die SCE-Frequenzen bei Bestrahlung in verschiedenen Zellzyklusphasen entwickeln, wurden CHO-Zellen mit BrdU vormarkiert und innerhalb der nächsten 20 Stunden zu verschiedenen Zeiten bestrahlt. Zwischen 0 und 9 Stunden ändert sich die SCE-Frequenz nicht. Die Zellen befinden sich vermutlich überwiegend in der G1-Phase, was auch daran deutlich wird, daß die Zellen bevorzugt CSA enthalten. Zwischen 20 und 36 % der Zellen zeigen jedoch CSA+CTA. Diese Zellen

könnten sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits in der frühen S-Phase befunden haben. Es wäre aber auch möglich, daß die Zellen in der G1-Phase bestrahlt wurden und die CTA aus S-Phase-abhängigen Läsionen hervorgehen. NATARAJAN *et al.* (1980) konnten nachweisen, daß Röntgenstrahlen in unsubstituierten G1-Zellen vorzugsweise CSA, in BrdU-substituierten Zellen in der G1-Phase hingegen häufig CSA+CTA induzierten. Möglicherweise rekrutieren sich diese CTA aus den gleichen Läsionen, die auch zu SCE führen. Dafür spricht ebenfalls, daß sowohl im Versuch zur Zellzyklusabhängigkeit strahleninduzierter SCE als auch in der Dosis-Effekt-Beziehung die SCE-Frequenzen eines Versuchspunktes in Zellen mit CSA und Zellen mit CSA+CTA in der Regel gleich sind.

Zwischen 9 und 16,5 Stunden sinkt die SCE-Frequenz auf den Wert der Kontrolle. Der Anteil an Zellen mit CSA nimmt kontinuierlich ab, der Anteil mit CSA+CTA hingegen zu. Dieser Zeitraum kann der S-Phase zugeordnet werden. Weil die strahleninduzierten BrdU-abhängigen Läsionen zur Entstehung von SCE offensichtlich die Replikation benötigen, können mit fortschreitender S-Phase immer weniger nicht-replizierte Chromosomenabschnitte getroffen werden. Bei 16,5 Stunden beginnt die G2-Phase, in der die SCE-Frequenzen den Kontrollwerten entsprechen.

Aus diesen Experimenten geht jedoch nicht hervor, wie sich BrdU-abhängige Strahlenschäden verhalten, die in replizierter DNS induziert wurden. Aus diesem Grund wurden CHO-Zellen mit BrdU vormarkiert und nach Bestrahlung mit Colcemid behandelt, so daß in der G2-Phase bestrahlte Zellen tetraploid wurden. In den Präparaten wurden sowohl tetraploide als auch diploide Zellen gefunden. Diploide Zellen befanden sich während der Bestrahlung vermutlich in der G1-Phase, denn ihre SCE-Frequenzen stimmen in etwa mit den Werten der Dosis-Effekt-Beziehung überein. Besonders auffällig ist die Verdopplung der Anzahl von SCE in tetraploiden Zellen gegenüber diploiden Zellen eines Versuchspunktes. Offenbar ist die Empfindlichkeit für strahleninduzierte SCE in der G1- und der G2-Phase gleich. Weiterhin kann gefolgert werden, daß langlebige Läsionen im BrdU sogar über die Mitose hinweg bis zur S-Phase keiner Reparatur unterliegen. Dies ist außergewöhnlich, denn im allgemeinen werden DNS-Schäden repariert. Es wäre zu erwarten gewesen, daß die SCE-Frequenz kleiner wird, wenn die Zelle länger Zeit bis zum Eintritt in die S-Phase hat. Offensichtlich besitzen CHO-Zellen außerhalb der S-Phase keine geeigneten Reparaturmechanismen für die Strahlenschäden in BrdU.

4.6 Einfluß der Substitution zellulärer DNS mit BrdU oder Biotin-dUTP auf die SCE-Induktion mit MMC

Der Einfluß von BrdU auf strahleninduzierte SCE-Frequenzen wurde in dieser Arbeit belegt. Für S-Phase-abhängige Mutagene kann hingegen angenommen werden, daß BrdU selbst keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß auf die SCE-Frequenz hat. Dies sollte am Beispiel der bifunktional alkylierenden Substanz MMC überprüft werden. MMC erzeugt Monoaddukte und DNS-DNS- sowie DNS-Protein-Vernetzungen (*Crosslinks*). Die Stickstoff- und Sauerstoffatome des Guanosins sind bevorzugte Angriffspunkte für die Alkylierung. MMC hemmt das Zellwachstum und induziert CA, vornehmlich CTA (IYER und SZYBALSKI 1964, TOMASZ *et al.* 1974, TOMASZ *et al.* 1988, SANDERSON und SHIELD 1996). Wie die meisten S-Phase-abhängigen Mutagene führt MMC zu einer Verdopplung der Anzahl von SCE bereits bei Konzentrationen, bei denen noch kaum CA induziert werden (PERRY und EVANS 1975). Die MMC-induzierten DNS-Schäden führen in der folgenden S-Phase zu SCE (NATARAJAN *et al.* 1983, WOLFF und AFZAL 1996).

Der Einfluß von BrdU auf die Induktion von SCE mit MMC wurde für 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM in unifilar mit 20 µM oder 0,5 µM BrdU substituierten Chromosomen untersucht. Bei diesen Konzentrationen wurden in der Regel keine CA gefunden. Präparate mit 20 µM BrdU wurden FPG-gefärbt, Präparate mit 0,5 µM BrdU-Substitution wurden immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die SCE-Frequenz in den Kontrollen mit 20 µM BrdU lag etwas höher als in Zellen mit niedriger BrdU-Substitution. Allerdings wurden für alle Behandlungspunkte signifikant niedrigere SCE-Frequenzen mit 20 µM BrdU als mit 0,5 µM BrdU gefunden. Zur genaueren Untersuchung dieses unerwarteten Ergebnisses wurden Präparate der Kontrollen und des Versuchspunkts mit 1 µM MMC nach Substitution mit 20 µM BrdU immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Werte für die Kontrollen mit 20 µM BrdU stimmten nach beiden Färbemethoden überein. Bei Analyse im Fluoreszenzmikroskop entsprach jedoch nach MMC-Behandlung die SCE-Frequenz mit 20 µM BrdU derjenigen für 0,5 µM BrdU. Offenbar ist die Darstellung der SCE mit Antikörpern präziser. Zusätzlich erleichtert die Auswertung am Bildschirm bei der Immunfluoreszenzmikroskopie die Analyse der SCE, so daß möglicherweise eng benachbarte SCE weniger häufig übersehen werden als im FPG-Präparat.

Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, daß unterschiedliche Dosen von BrdU die SCE-Frequenz nach Behandlung mit MMC nicht beeinflussen. Zur Untermauerung dieses

Ergebnisses wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem Zellen mit Biotin-dUTP oder mit 0,5 μM BrdU markiert und anschließend mit 0,1 μM MMC behandelt wurden. In Biotin-markierten Zellen lag die Häufigkeit der SCE nach Korrektur auf den vollständigen Chromosomensatz bei 12,7 SCE pro Zelle, in BrdU-substituierten Zellen signifikant höher bei 15,4 SCE pro Zelle. Diese Unterschiede sind möglicherweise methodisch bedingt. Es ist nicht auszuschließen, daß der Nachweis von SCE in sehr kleinen Abständen in Biotin-markierten Präparaten mit TRITC-konjugiertem Avidin nicht so genau erfolgt wie in BrdU-Präparaten mit Immunfluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zu Röntgenstrahlen, die selten SCE in sehr kleinen Abständen induzieren, können SCE nach MMC-Behandlung so eng beieinander liegen, daß sie selbst nach Markierung mit BrdU und Antikörpernachweis bei flüchtiger Betrachtung den Eindruck machen, als seien abschnittsweise beide Chromatiden mit BrdU markiert (*Isolabelling*). Ähnliche Schwierigkeiten traten beim Nachweis von SCE mit Autoradiographie auf (WOLFF und PERRY 1975).

Die Methode der Schwesterchromatidendifferenzierung mit Biotin-dUTP kann möglicherweise noch verbessert werden. Erstrebenswert wäre eine gleichmäßigere Fluoreszenzfärbung. Eine Möglichkeit könnte im Einsatz von Streptavidin, einem Protein aus *Streptomyces avidinii*, zum Nachweis des Biotins bestehen, das nach Beobachtungen von HIRIYANNA *et al.* (1988) spezifischer an Biotin bindet als Avidin. Für den Einsatz als Routinemethode zur Darstellung von SCE wäre eine effektivere Aufnahme des Biotin-dUTP in die Zellen wünschenswert. Vielleicht ist die Elektroporation nicht die optimale Methode für die Aufnahme von Biotin-dUTP in CHO-Zellen. Möglicherweise wäre die Permeabilisierung mit Lysolecithin eine geeignetere Methode (BANFALVI *et al.* 1989, 1990, HUIJZER und SMERDON 1992).

Mit der hier vorgestellten Schwesterchromatidendifferenzierung mit Biotin-dUTP steht eine neue Methode zur Verfügung, die einen entscheidenden Nachteil des SCE-Tests mit BrdU vermeidet, nämlich die Beeinflussung des Testergebnisses aufgrund einer induzierten radikalen Dissoziation des BrdU.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Röntgenstrahlen induzieren in unifilar BrdU-substituierten G1-CHO-Zellen einen dosisabhängigen Anstieg der SCE-Frequenz mit den Charakteristika einer linear-quadratischen Dosis-Effekt-Beziehung. Ein höherer Substitutionsgrad mit BrdU führt zu einer zusätzlichen Erhöhung der Anzahl an SCE nach Bestrahlung. In Versuchen mit Endoreduplikationen induzieren Röntgenstrahlen nur dann SCE, wenn BrdU-markierte Zellen bestrahlt werden. Die SCE entstehen nur in der ersten S-Phase nach Bestrahlung.

Wenn unifilar substituierte Chromosomen bestrahlt werden, können CA entstehen, bei denen markierte und unmarkierte DNS-Einzelstränge rekombiniert werden. Die Verknüpfungen zeigen sich nach einer S-Phase in der folgenden Mitose als „falsche“ SCE. Wenn die Anzahl ringförmiger Chromosomen oder Chromosomenfragmente mit Inversionen und entsprechend dizentrische Chromosomen mit reziproken Translokationen gleichgesetzt werden, können die Häufigkeiten „falscher“ SCE berechnet werden. Allerdings können bei weitem nicht alle induzierten SCE nach Bestrahlung unifilar BrdU-substituierter Zellen als Folge von CA erklärt werden, es müssen somit auch „echte“ SCE vorkommen.

BrdU neigt unter Bestrahlung verstärkt zur Radikalbildung unter Abspaltung des Broms. Zur Abschätzung des Anteils strahleninduzierter SCE, die auf derartigen Radikalen beruhen, muß ein Nukleotid zur Markierung verwendet werden, das unter Bestrahlung keine radikale Dissoziation aufweist. Hierfür wurde in dieser Arbeit Biotin-dUTP eingesetzt. Bis zu 10 % der Metaphasen zeigen 26 Stunden nach Permeabilisierung für Biotin-dUTP mit Elektroporation eine durchgehende, aber oft etwas körnige Markierung in einer der beiden Schwesterchromatiden. Röntgenbestrahlung von unifilar Biotin-dUTP-markierten Zellen führt zu einer Erhöhung der SCE-Frequenzen, die sich jedoch vollständig auf CA zurückführen lassen und somit „falsch“ sind. Diese Ergebnisse bestätigen, daß ein großer Anteil der SCE nach Bestrahlung von BrdU-substituierten Zellen aus Schäden im BrdU entsteht. Derartige Läsionen lassen sich gleichermaßen in der G1- und G2-Phase induzieren und unterliegen offenbar bis zur nächsten S-Phase keiner Reparatur.

G1-Bestrahlung von unifilar BrdU-substituierten Zellen führt neben Chromosomentypaberrationen auch zu Chromatidentypaberrationen, die - wie BrdU-abhängige SCE - ebenfalls S-Phase-abhängig entstehen.

Für S-Phase-abhängige Mutagene kann aufgrund ihrer Fähigkeit, nach Behandlung von unsubstituierten Zellen effizient SCE zu induzieren, angenommen werden, daß BrdU keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die SCE-Frequenz hat. Dies wurde am Beispiel der bifunktional alkylierenden Substanz Mitomycin C belegt. Unterschiedliche BrdU-Dosen zur Vormarkierung der DNS beeinflussen die SCE-Frequenz nach Behandlung mit MMC nicht. Der parallel durchgeführte Test mit Biotin-dUTP-Substitution ergab nach Behandlung mit MMC allerdings etwas niedrigere Werte für SCE als nach BrdU-Differenzierung.

Die neue Methode zur Differenzierung von Schwesterchromatiden mit Biotin-dUTP bietet eine Möglichkeit, die Beeinflussung des SCE-Tests aufgrund der radikalen Dissoziation von BrdU zu umgehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

AFZAL, V., FEENEY, L., THOMAS, G.H., VOLPE, J.P.G., AND CLEAVER, J.E. (1995). Sister chromatid exchanges in cells defective in mismatch, postreplication and excision repair. *Mutagenesis*, 10, 457-462

ALEXANDRU, G., ZACHARIAE, W., SCHLEIFFER, A., AND NASMYTH, K. (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *The EMBO Journal*, 18, 2707-2721

AU, W.W., O'NEILL, J.P., WANG, W., LUIPPOLD, H.E., AND PRESTON, R.J. (1984). Induction of chromosome aberrations and specific locus mutation but not sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by neocarzinostatin. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 4, 515-522

BALAJEE, A.S., AND NATARAJAN, A.T. (1993). Restriction endonucleases *do* induce sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, 302, 25-31

BAN, S., IIDA, S., SHIMBA, H., AWA, A.A., NOWAK, S.M., AND SUGAHARA, T. (1983). Induction of endoreduplication in Chinese hamster V79 cells by cytosine arabinoside. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 113, 142-147

BANFALVI, G., TANKE, H., RAAP, A.K., SLATS, J., AND VAN DER PLOEG, M. (1990). Early replication signals in nuclei of Chinese hamster ovary cells. *Histochemistry*, 94, 435-440

BANFALVI, G., WIEGANT, J., SARKAR, N., AND VAN DUIJN, P. (1989). Immunofluorescent visualization of DNA replication sites within nuclei of Chinese hamster ovary cells. *Histochemistry*, 93, 81-86

BEEK, B., AND OBE, G. (1975). The human leukocyte system. IV. The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities. *Humangenetik*, 29, 127-134

- BENDER, M.A., BEDFORD, J.S., AND MITCHELL, J.B. (1973). Mechanisms of chromosomal aberrations production. II. Aberrations induced by 5-bromodeoxyuridine and visible light. *Mutation Research*, 20, 403-416
- BENDER, M.A., GRIGGS, H.G., AND BEDFORD, J.S. (1974). Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutation Research*, 23, 197-212
- BREWEN, J.G., AND PEACOCK, W.J. (1969). The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchange in a ring chromosome. *Mutation Research*, 7, 433-440
- BRUCKMANN, E., WOJCIK, A., AND OBE, G. (1999a). Sister chromatid differentiation with biotin-dUTP. *Chromosome Research*, 7, 185-189
- BRUCKMANN, E., WOJCIK, A., AND OBE, G. (1999b). X-irradiation of G1 CHO cells induces SCE which are both true and false in BrdU-substituted cells but only false in biotin-dUTP-substituted cells. *Chromosome Research*, 7, 277-288
- BRYANT, P.E. (1990). Restriction endonuclease- and radiation-induced DNA double-strand breaks and chromosomal aberrations: similarities and differences. In: Obe, G., and Natarajan, A.T. (Eds.). *Chromosomal Aberrations: Basic and Applied Aspects*, pp 61-69, Springer Verlag, Berlin
- CHAGANTI, R.S.K., SCHONBERG, S., AND GERMAN, J. (1974). A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 4508-4512
- CHANG, D.C., SAUNDERS, J.A., CHASSY, B.M., AND SOWERS, A.E. (1992). Overview of electroporation and electrofusion. In: Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. (Eds.). *Guide to Electroporation and Electrofusion*, pp 1-6, Academic Press, San Diego, California

CLEAVER, J.E. (1981). Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes.

Experimental Cell Research, 136, 27-30

CLEAVER, J.E., MITCHELL, D.L., FEENEY, L., AND AFZAL, V. (1996). Chromatid exchanges may be induced by damage in sites of transcriptional activity.

Mutagenesis, 11, 183-187

DAVIDSON, R.L., BROEKER, P., AND ASHMAN, C.R. (1988). DNA base sequence changes and sequence specificity of bromodeoxyuridine-induced mutations in mammalian cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85, 4406-4410

DEWEY, W.C., AND HUMPHREY, R.M. (1965). Increase in radiosensitivity to ionizing radiation related to replacement of thymidine in mammalian cells with 5-bromodeoxyuridine.

Radiation Research, 23, 538-553

DILLEHAY, L.E., THOMPSON, L.H., AND CARRANO, A.V. (1984). DNA-strand breaks associated with halogenated pyrimidine incorporation.

Mutation Research, 131, 129-136

DJORDJEVIC, B., AND SZYBALSKI, W. (1960). Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiosensitivity.

Journal of Experimental Medicine, 112, 509-531

EVANS, H.J. (1977). What are sister chromatid exchanges?

Chromosomes Today, 6, 315-326

FOLLE, G.A., BOCCARDO, E., AND OBE, G. (1997). Localization of chromosome breakpoints induced by DNase I in Chinese hamster ovary (CHO) cells.

Chromosoma, 106, 391-399

FOLLE, G.A., JOHANNES, C., MECHOSO, B.H., MEDINA, I.I., AND OBE, G. (1992). The restriction endonuclease *A₁II* induces sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells.

Mutagenesis, 7, 291-294

FRESE, E. (1959). The specific mutagenic effect of base analogues on phage T4.

Journal of Molecular Biology, 1, 87-105

FUKAMI, J.-I., YAKAMOTO, I., AND CASIDA, J.E. (1967). Metabolism of rotenone in vitro by tissue homogenates from mammals and insects.

Science, 155, 713-716

GALLOWAY, S.M., BLOOM, A.D., RESNICK, M., MARGOLIN, B.H., NAKAMURA, F., ARCHER, P., AND ZEIGER, E. (1985). Development of a standard protocol for in vitro cytogenetic testing with Chinese hamster ovary cells: comparison of results for 22 compounds in two laboratories.

Environmental Mutagenesis, 7, 1-51

GIBSON, D.A., AND PRESCOTT, D.M. (1972). Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporated DNA.

Experimental Cell Research, 74, 397-402

GOLDBERG, I.H. (1991). Mechanisms of neocarcinostatin action: role of DNA microstructure in determination of chemistry of bistranded oxidative damage.

Accounts of Chemical Research, 24, 191-199

GOTTESMAN, M.M. (1985). Growth properties of Chinese hamster ovary (CHO) cells. In: Gottesman, M.M. (Ed.). Molecular Cell Genetics, pp 139-154. A Wiley-Interscience Publication, New York

GOYANES, V.J., AND MÉNDEZ, J. (1982). Extracentromeric connections between sister chromatids demonstrated in human chromosomes induced to condense asymmetrically.

Human Genetics, 62, 324-326

GOYANES, V.J., AND SCHVARTZMAN, J.B. (1981). Insights on diplochromosome structure and behaviour.

Chromosoma, 83, 93-102

GREEN, N.M. (1975). Avidin.

Advanced Protein Chemistry, 29, 85-133

GUADAÑO, A., GONZÁLEZ-COLOMA, A., AND DE LA PEÑA, E. (1998). Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes.

Mutation Research, 414, 1-7

HAKALA, M.T. (1959). Mode of action of 5-bromodeoxyuridine on mammalian cells in culture.

Journal of Biological Chemistry, 234, 3072-3076

HILL, A., AND WOLFF, S. (1982). Increased induction of sister chromatid exchanges by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women.

Cancer Research, 42, 893-896

HIRIYANNA, K.T., VARKEY, J., BEER, M., AND BENBOW, R.M. (1988). Electron microscopic visualization of sites of nascent DNA synthesis by streptavidin-gold binding to biotinylated nucleotides incorporated in vivo.

The Journal of Cell Biology, 107, 33-44

HOLLIDAY, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi.

Genetical Research, 5, 282-304

HOLMQUIST, G.P., AND MOTARA, M.A. (1987). The magic of cytogenetic technology. In: Obe, G., and Basler, A. (Ed.). Cytogenetics, pp 30-47, Springer Verlag, Berlin

HSU, T.C., AND SOMERS, C.E. (1961). Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 47, 396-403

- HUANG, C.C. (1967). Induction of a high incidence of damage to the X chromosome of *Rattus (Mastomys) natalensis* by base analogs, viruses and carcinogens.
Chromosoma, 23, 162-179
- HUIJZER, J.C., AND SMERDON, M.J.(1992). Characterization of biotinylated repair regions in reversibly permeabilized human fibroblasts.
Biochemistry, 31, 5077-5084
- HUNTING, D.J., DRESLER, S.L., AND DE MURCIA, G. (1985). Incorporation of biotin labeled deoxyuridine triphosphate into DNA during excision repair and electron microscopic visualization of repair patches.
Biochemistry, 24, 5729-5734
- HUTCHINSON, F. (1973). The lesions produced by ultraviolet light in DNA containing 5-bromouracil.
Quarterly Reviews of Biophysics, 6, 201-246
- ILIAKIS, G., PANTELIS, G., AND KURTZMAN, S. (1991). Mechanism of radiosensitization of halogenated pyrimidines: effect of BrdU on cell killing and interphase chromosome breakage in radiation-sensitive cells.
Radiation Research, 125, 56-64
- ISHII, Y., AND BENDER, M.A. (1980). Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells.
Mutation Research, 79, 19-32
- IYER, V.M., AND SZYBALSKI, W. (1964). Mitomycins and porfiromycins: chemical mechanisms of activation and crosslinking of DNA.
Science, 145, 55-58
- JACKSON, D.A. (1995). S-phase progression in synchronized human cells.
Experimental Cell Research, 220, 62-70

- JOHANNES, C., CHUDоба, I., AND OBE, G. (1999). Analysis of X-ray-induced aberrations in human chromosome 5 using high-resolution multicolour banding FISH. *Chromosome Research*, 7, 625-633
- KAINA, B., ZIOUTA, A., OCHS, K., AND COQUERELLE, T. (1997). Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺, and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutation Research*, 381, 227-241
- KAO, F.-T., AND PUCK, T.T. (1969). Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. *Journal of Cell Physiology*, 74, 245-258
- KATO, H. (1977). Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma*, 59, 179-191
- KAUFMAN, E.R. (1986). Induction of sister-chromatid exchanges by the replication of 5-bromouracil-substituted DNA under condition of nucleotide-pool imbalance. *Mutation Research*, 163, 41-50
- KAUFMAN, E.R. (1988). The role of deoxyribonucleotide metabolism in 5-bromo-2'-deoxyuridine mutagenesis in mammalian cells. *Mutation Research*, 200, 149-155
- KING, R.C. (1972). *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press, New York
- LATT, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3395-3399
- LATT, S.A., AND WOHLLEB, J.C. (1975). Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 52, 297-316

LATT, S.A., ALLEN, J., BLOOM, S.E., CARRANO, A., FALKE, E., KRAM, D., SCHNEIDER, E., SCHRECK, R., TICE, R., WHITFIELD, B., AND WOLFF, S. (1981). Sister-chromatid exchanges: A report of the Gene-Tox program.

Mutation Research, 87, 17-62

LAU, Y.-F., AND ARRIGHI, F.E. (1981). Studies of mammalian chromosome replication. II. Evidence for the existence of defined chromosome replicating units.

Chromosoma, 83, 721-741

LEVAN, A., AND HAUSCHKA, T.S. (1953). Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse.

Journal of the National Cancer Institute, 14, 1-43

LINDENHAHN, M., AND SCHUBERT, I. (1983). On the origin of hydroxyurea-induced chromatid aberrations in G2 chromosomes with BrdUrd in only one of the sister chromatids.

Mutation Research, 108, 301-316

LITTLEFIELD, L.G., COLYER, S.P., JOINER, E.E., AND DUFRAIN, R.J. (1979). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during G₀.

Radiation Research, 78, 514-521

LUCHNIK, N.V., ANTOSHCHINA, M.M., AND PORJADKOVA, N.A. (1981). On the radiosensitivity of uni- and bifilary BrdUrd-substituted chromatids.

Mutation Research, 91, 463-465

LÜCKE-HUHLE, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during α -radiation induced G2 arrest.

Mutation Research, 407-413

LUGO, M.H., RAUCHFUSS, H.S., ZAKOUR, H.R., ALLEN, J.W., AND HOZIER, C. (1989). Evidence for chromosomal replicons as units of sister chromatid exchanges.

Chromosoma, 98, 69-76

- MAKINO, R., AND MUNAKATA, N. (1979). Excision of uracil from bromodeoxyuridine substituted and UV-irradiated DNA in cultured mouse lymphoma cells.
International Journal of Radiation Biology, 36, 349-357
- MARSDEN, M.P.F., AND LAEMMLI, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model.
Cell, 17, 849-858
- MATSUMOTO, K., AND OHTA, T. (1991). Rotenone induces aneuploidy, polyploidy and endoreduplication in cultured Chinese hamster cells.
Mutation Research, 263, 173-177
- MATSUMOTO, K., AND OHTA, T. (1992). Sensitive period for the induction of endoreduplication by rotenone in cultured Chinese hamster cells.
Chromosoma, 102, 60-65
- MATSUMOTO, K., AND OHTA, T. (1994). Chemical induction of quadruple and octuple chromosomes in Chinese hamster CHO-K1 cells and relationship between their three-dimensional structure and spatial distribution of BrdU-labeled chromatids.
Chromosoma, 103, 338-342
- MATSUMOTO, K., AND OHTA, T. (1995). Phases of the cell cycle sensitive to endoreduplication induction in CHO-K1 cells.
Mutation Research, 326, 93-98
- MCCLINTOCK, B. (1938). The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes.
Genetics, 23, 315-376
- MESCHINI, R., BASTIANELLI, R., AND PALITTI, F. (1996). The diplochromosomes of endoreduplicated cells: a new approach to highlight the mechanism of sister chromatid exchange.
Chromosoma, 105, 50-54

- MICHAELIS, A. (1959). Über das Verhalten eines Ringchromosoms in der Mitose und Meiose von *Antirrhinum majus* L.
Chromosoma, 10, 144-162
- MORALES-RAMÍREZ, P., RODRÍGUEZ-REYES, R., AND VALLARINO-KELLY, T. (1987). Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges in vivo by three-way differentiation.
Mutation Research, 178, 49-56
- MORGAN, W.F., AND CROSSEN, P.E. (1980). X irradiation and sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes.
Environmental Mutagenesis, 2, 149-155
- MORGAN, W.F., BODYCOTE, J., DOIDA, Y., FERO, M.L., HAHN, P., AND KAPP, L.N. (1986). Spontaneous and 3-aminobenzamide-induced sister-chromatid exchange frequencies estimated by ring chromosome analysis.
Mutagenesis, 1, 453-459
- MORRIS, S.M. (1991). The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells.
Mutation Research, 258, 161-188
- MÜHLMANN-DÍAZ, M.C., AND BEDFORD, J.S. (1995). Comparison of gamma-ray-induced chromosome ring and inversion frequencies.
Radiation Research, 143, 175-180
- NAKAYASU, H., AND BEREZNEY, R. (1989). Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus.
The Journal of Cell Biology, 108, 1-11
- NATARAJAN, A.T., AND OBE, G. (1984). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases.
Chromosoma, 90, 120-127

- NATARAJAN, A.T., AND VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN, A.C. (1981). The mutagenic activity of 20 coded compounds in chromosome aberrations/sister chromatid exchanges assay using Chinese hamster ovary (CHO) cells. In: de Serres, F.J., and Ashby, J. (Eds.). *Progress in Mutation Research*, Vol. 1, pp 551-559, Elsevier, Amsterdam
- NATARAJAN, A.T., CSUKÁS, I., AND VAN ZEELAND, A.A. (1981). Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister-chromatid exchanges induced by inhibitors of poly-(ADP-ribose)-polymerase. *Mutation Research*, 84, 125-132
- NATARAJAN, A.T., KIHLMAN, B.A., AND OBE, G. (1980). Use of the 5-bromodeoxyuridine-labelling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations. II. G1 experiments with Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, 73, 307-317
- NATARAJAN, A.T., MULLENDERS, L.H.F., MEIJERS, M., AND MUKHERJEE, U. (1985). Induction of sister-chromatid exchanges by restriction endonucleases. *Mutation Research*, 144, 33-39
- NATARAJAN, A.T., ROTTEVEEL, A.H.M., VAN PIETERSON, J., AND SCHLIERMANN, M.G. (1986). Influence of incorporated 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of spontaneous and induced sister-chromatid exchanges, detected by immunological methods. *Mutation Research*, 163, 51-55
- NATARAJAN, A.T., TATES, A.D., MEIJERS, M., NEUTEBOOM, I., AND DE VOGEL, N. (1983). Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mitomycin C and methylmethanesulfonate in Chinese hamster ovary cells. An evaluation of methodology for detection of SCEs and of persistent DNA lesions towards the frequencies of observed SCEs. *Mutation Research*, 121, 211-223
- OBE, G., AND WINKEL, E.-U. (1985). The chromosome-breaking activity of the restriction endonuclease *A₁II* in CHO cells is independent of the S-phase of the cell cycle. *Mutation Research*, 152, 25-29

OBE, G., JOHANNES, C., AND SCHULTE-FROHLINDE, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation.

Mutagenesis, 7, 3-12

OBE, G., PALITTI, F., TANZARELLA, C., DEGRASSI, F., AND DE SALVIA, R. (1985). Chromosomal aberrations induced by restriction endonucleases.

Mutation Research, 150, 359-368

OBE, G., SCHUNCK, C., AND JOHANNES, C. (1994). Induction of sister-chromatid exchanges by *AluI*, DNase I, benzon nuclease and bleomycin in Chinese hamster ovary cells.

Mutation Research, 307, 315-321

OCKEY, C.H., AND SAFFHILL, R. (1986). Delayed DNA maturation, a possible cause of the elevated sister chromatid exchange in Bloom's syndrome.

Carcinogenesis, 7, 53-57

OKSALA, T., AND THERMAN, E. (1974). Mitotic abnormalities and cancer. In: German, J. (Ed.). Chromosomes and Cancer, pp 239-263, New York

ORTIZ, T., PIÑERO, J., AND CORTÉS, F. (1996). On the importance of DNA strand breaks as the first event to initiate sister chromatid exchange (SCE): experiments with restriction endonuclease *BglI*.

Chromosome Research, 4, 540-544

PAINTER, R.B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange.

Mutation Research, 70, 337-341

PATKIN, E.L., KUSTOVA, M.E., AND DYBAN, A.P. (1994). Spontaneous sister chromatid differentiation (SCD) and sister chromatid exchange (SCE) in mouse blastocyst chromosomes.

Cytogenetics and Cell Genetics, 66, 31-32

- PERRY, P. (1980). Chemical mutagens and sister-chromatid exchange. In: de Serres, F.J., and Hollaender, A. (Eds.). Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, Vol. 6, pp 1-39, Plenum Press, New York
- PERRY, P., AND EVANS, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange.
Nature, 258, 121-125
- PERRY, P., AND WOLFF, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids.
Nature, 251, 156-158
- PINGOUD, A., ALVES, A., AND GEIGER, R. (1993). Restriction enzymes. In: Burrell, M.M. (Ed.). Methods in Molecular Biology, Vol. 16: Enzymes of Molecular Biology. Humana Press, Inc., Totowa, NJ
- PINKEL, D., THOMPSON, L.H., GRAY, J.W., AND VANDERLAAN, M. (1985). Measurement of sister-chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells.
Cancer Research, 45, 5795-5798
- POVIRK, L.F., AND AUSTIN, M.J.F. (1991). Genotoxicity of bleomycin.
Mutation Research, 257, 127-243
- PUCK, T.T. (1985). Development of the Chinese hamster ovary (CHO) cell for the use in somatic cell genetics. In: Gottesman, M.M. (Ed.). Molecular Cell Genetics, pp 37-64. A Wiley-Interscience Publication, New York
- RACHEL, A.J., SHARMA, T., AND MENON, V.V. (1991). Harlequin banding and localisation of sister-chromatid exchanges.
Mutation Research, 264, 71-80
- REICHARD, P. (1988). Interaction between deoxyribonucleotide and DNA synthesis.
Annual Reviews of Biochemistry, 57, 349-374

- RIZZONI, M., AND PALITTI, F. (1973). Regulatory mechanism of cell division, I. Colchicine-induced endoreduplication.
Experimental Cell Research, 77, 450-458
- ROMMELAERE, J., AND MILLER-FAURÈS, A. (1975). Detection by density equilibrium centrifugation of recombinant-like DNA molecules in somatic mammalian cells.
Journal of Molecular Biology, 98, 195-218
- SANDBERG, A.A., AND BLOCK, A.W. (1988). Sister chromatid exchange. In: Adolph, K.W. (Ed.). Chromosomes and Chromatin, Vol. II, pp 123-146, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- SANDERSON, B.J., AND SHIELD, A.J. (1996). Mutagenic damage to mammalian cells by alkylating agents.
Mutation Research, 355, 41-57
- SATOH, T., AND OBARA, Y. (1995). Nonrandom distribution of sister chromatid exchanges in the chromosomes of three mammalian species.
Zoological Science, 12, 749-756
- SAVAGE, J.R.K. (1976). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes.
Journal of Medical Genetics, 13, 103-122
- SAX, K. (1938). Induction by X-rays of chromosome aberrations in *Tradescantia* microspores.
Genetics, 23, 494-526
- SCHNEDL, W. (1967). Geregelte Anordnung der Chromatidunterheiten in den Diplochromosomen bei der Endoreduplikation.
Humangenetik, 4, 140-152
- SCHUBERT, I. (1990). Sister chromatid exchanges and chromatid aberrations: a comparison.
Biologisches Zentralblatt, 109, 7 – 18

SCHUBERT, I., AND RIEGER, R. (1981). Sister chromatid exchanges and heterochromatin. *Human Genetics*, 57, 119-130

SCHUBERT, I., STURELID, S., DÖBEL, P., AND RIEGER, R. (1979). Intrachromosomal distribution patterns of mutagen-induced sister chromatid exchanges and chromatid aberrations in reconstructed karyotypes of *Vicia faba*. *Mutation Research*, 59, 27-38

SCHULTE-FROHLINDE, D. (1990). Die Chemie des zellulären Strahlentodes. *Chemie in unserer Zeit*, 24, 37-44

SCHUNCK, C. (1997). Zur Entstehung von Schwesterchromatidenaustauschen und Chromosomenaberrationen. Experimente mit verschiedenen DNS-Doppelstrangbruch-induzierenden Agenzien. Logos-Verlag, Berlin

SCHUNCK, C., AND OBE, G. (1995). Neocarzinostatin induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis*, 10, 37-42

SCHVARTZMAN, J.B., AND GOYANES, V. (1980). A new method for the identification of SCE's per cell cycle in BrdUrd substituted chromosomes. *Cell Biology International Reports*, 4, 415-423

SCHWARZACHER, H.G., AND SCHNEDL, W. (1966). Position of labeled chromatids in diplochromosomes of endo-reduplicated cells after uptake of tritiated thymidine. *Nature*, 209, 107-108

SHAFFER, D.A. (1977). Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Human Genetics*, 39, 177-190

SHIRAISHI, Y., YOSIDA, T.H., AND SANDBERG, A.A. (1983). Analyses of bromodeoxyuridine-associated sister chromatid exchanges (SCEs) in Bloom syndrome based on cell fusion: Single and twin SCEs in endoreduplication.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80, 4369-4373

SICILIANO, M.J., STALLINGS, R.L., AND ADAIR, G.M. (1985). The genetic map of the Chinese hamster and the genetic consequences of chromosomal rearrangements in CHO cells. In: Gottesman, M.M. (Ed.). Molecular Cell Genetics, pp 95-135. A Wiley-Interscience Publication, New York

SONODA, E., SASAKI, M.S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M., AND TAKEDA, S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells.

Molecular and Cellular Biology, 19, 5166-5169

SPEIT, G., MEHNERT, K., AND VOGEL, W. (1984). Induction of endoreduplication by hydrazine in Chinese hamster V79 cells and reduced incidence of sister chromatid exchanges in endoreduplicated mitoses.

Chromosoma, 89, 79-84

SPEIT, G., VOGEL, W., AND MEHNERT, K. (1985). Do the frequencies of sister chromatid exchanges in endoreduplicated mitoses provide a measure for lesion persistence and repair?

Chromosoma, 91, 369-371

SUTOU, S. (1981). Spontaneous sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vivo and in vitro.

Mutation Research, 82, 331-341

TAKANARI, H. (1985). Studies on endoreduplication. V. A three-dimensional scheme for diplo- and quadruple chromosomes and a model for DNA replication.

Cytogenetics and Cell Genetics, 39, 188-193

TAKANARI, H., KATSUTA, K., YOSHIDA, T., YATANI, R., AND IZUTSU, K. (1991). Rare chromosomal aberrations induced by vincristine. Partial endoreduplication and pseudoendoreduplication, segmentally endoreduplicated chromosomes, and segmental premature chromosome condensation.

Cancer Genetics and Cytogenetics, 51, 155-165

TAKANARI, H., NAKAKUKI, K., AND IZUTSU, K. (1985). Cytogenetic demonstration of out-of-phase DNA synthesis in endoreduplicated CHO cells: evidence for partial endoreduplication.

Cytogenetics and Cell Genetics, 39, 93-98

TAKAYAMA, S., HIRANO, Y., AND HIRAMATSU, H. (1992). Induction of endoreduplication in double minutes of the human neuroblastoma cells and the replication pattern.

Japanese Journal of Genetics, 67, 397-403

TAYLOR, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes.

Genetics, 43, 515-529

TAYLOR, J.H. (1990). Chromosome reproduction: units of DNA for segregation.

BioEssays, 12, 289-296

TAYLOR, J.H., WOODS, P.S., AND HUGHES, M.L. (1957). The organisation and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 43, 122-128

TIJO, J.H., AND PUCK, T.T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture.

Journal of Experimental Medicine, 108, 259-268

TOMASZ, M., CHAWLA, A.K., AND LIPMAN, R. (1988). Mechanism of monofunctional and bifunctional alkylation of DNA by mitomycin C.

Biochemistry, 27, 3182-3187

TOMASZ, M., MERCADO, C.M, OLSON, J., AND CHATTERJEE, N. (1974). The mode of interaction of mitomycin C with deoxyribonucleic acid and other polypeptides in vitro. *Biochemistry*, 13, 4878-4887

TUCKER, J.D., AULETTA, A., CIMINO, M.C., DEARFIELD, K.L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R.R., AND CARRANO, A.V. (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutation Research*, 297, 101-180

WALEN, K.H. (1965). Spatial relationships in the replication of chromosomal DNA. *Genetics*, 51, 915-929

WARD, J.F. (1994). The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *International Journal of Radiation Biology*, 66, 427-432

WATSON, J.D., AND CRICK, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, 737-738

WEISSENBORN, U., JOHANNES, C., RAESFELD, C., AND OBE, G. (1994). Potentiation of the cytogenetic effects of bleomycin in mammalian cells by membrane permeabilization. *Biologisches Zentralblatt*, 113, 53-67

WINEGAR, R.A., PHILLIPS, J.W., YOUNGBLOM, J.H., AND MORGAN, W.F. (1989). Cell electroporation is a highly efficient method for introducing restriction endonucleases into cells. *Mutation Research*, 225, 49-53

WOJCIK, A., OPALKA, B., AND OBE, G. (1999). Analysis of inversions and sister chromatid exchanges in chromosome 3 of human lymphocytes exposed to X-rays. *Mutagenesis*, 14, 633-638

WOLFF, S., AND AFZAL, V. (1996). Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids and the use of endoreduplicated cells to track sister chromatid exchanges induced by crosslinks, alkylations, or x-ray damage.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 5765-5769

WOLFF, S., AND FIJTMAN, N. (1981). X-ray sensitization of chromatids with unifilarly and bifilarly substituted DNA.

Mutation Research, 80, 133-140

WOLFF, S., AND PERRY, P. (1974). Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography

Chromosoma, 48, 341-353

WOLFF, S., AND PERRY, P. (1975). Insights on chromosome structure from sister chromatid exchange ratios and the lack of both isolabelling and heterolabelling as determined by the FPG technique.

Experimental Cell Research, 93, 23-30

WOLFF, S., BODYCOTE, J., AND PAINTER, R.B. (1974). Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S.

Mutation Research, 25, 73-81

ZAKHAROV, A.F. AND EGOLINA, N.A. (1972). Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes.

Chromosoma, 38, 341-365

ZWANENBURG, T.S.B., AND NATARAJAN, A.T. (1984). 3-Aminobenzamide-induced sister chromatid exchanges are dependent on incorporated bromodeoxyuridine in DNA.

Mutation Research, 38, 278-281

ZWANENBURG, T.S.B., MULLENDERS, L.H.F., NATARAJAN, A.T., AND VAN ZEELAND, A.A. (1984). DNA lesions, chromosomal aberrations and G₂ delay in CHO cells cultured in medium containing bromo- or chloro-deoxyuridine. Mutation Research, 127, 155-168

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Obe, der meine Arbeit betreute und mir mit zahlreichen Anregungen und steter Diskussionsbereitschaft zur Seite stand.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Genetik, die mir mit konstruktiver Kritik und steter Hilfsbereitschaft beistanden.

Ausdrücklich möchte ich Herrn Dr. Wilner Martinez Lopez vom Instituto de Investigaciones Biologicas Clemente Estable in Montevideo, Uruguay, und Herrn Prof. Dr. Andrzej Wojcik vom Institute of Chemistry and Nuclear Technology in Warschau, Polen, danken, die während ihrer Gastaufenthalte in Essen mit vielen stimulierenden Diskussionen und freundlicher Unterstützung wesentlich zum Fortgang meiner Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern danke ich für ihre langjährige Unterstützung.

Lebenslauf

Name:	Elisabeth Bruckmann
Geburtsdatum und -ort:	30.10.1970 in Kempen
Schullaufbahn:	Pestalozzi-Grundschule in Krefeld von 1977 bis 1981 Ricarda-Huch-Gymnasium in Krefeld von 1981 bis 1990
Schulabschluß:	Abitur 1990
Studium:	Lehramt Sekundarstufe I und II mit den Fächern Biologie und Sport an der Universität GH Essen vom WS 1990/91 bis WS 1996/97 Medizin an der Universität GH Essen seit WS 1994/95; Physikum SS 1999
Hochschulabschluß:	28.11.1996 Erste Staatsprüfung für die Lehramter für die Sekundarstufe II und I
Berufstätigkeit:	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Zentralstelle für Forschungs- und Entwicklungstransfer (FET) der Universität GH Essen von Januar bis April 1997
Promotion:	seit 1. Mai 1997 im Institut für Genetik des Fachbereichs 9 der Universität GH Essen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Obe
Referendariat:	seit 1. Februar 2000 Referendariat am Studienseminar für das Lehramt für die Sekundarstufe II (Berufskolleg) Dortmund II
Essen, im Oktober 2000	